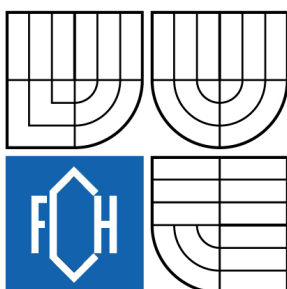




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE PURINOVÝCH METABOLITŮ A JEJICH ISOSTERŮ

ELECTROCHEMICAL DETECTION OF PURINE METABOLITES AND THEIR ISOSTERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

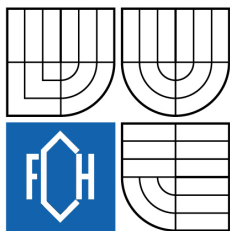
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PETRA SPRUŽINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDR. FRANTIŠEK JELEN, CSC.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0382/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Petra Spružinová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. František Jelen, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Elektrochemická detekce purinových metabolitů a jejich isosterů

Zadání bakalářské práce:

Stanovení obsahu purinových metabolitů a jejich strukturních analogů ve vzorku je důležitým biotechnologickým a klinickým analytickým postupem. Bakalářská práce (BP) se bude zabývat stanovením těchto látek pomocí elektrochemických metod, jako je cyklická voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a chronopotenciometrie. BP se bude zabývat elektrochemickými vlastnostmi purinových derivátů s cílem optimalizovat detekční metody založené na rozpouštěcí analýze a bude zahrnovat elektrochemická měření, včetně přípravy vzorků a práci s malými objemy vzorku. Experimentální práce bude provedena na BFÚ AV ČR.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petra Spružinová
Student(ka)

RNDr. František Jelen, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Analýza některých důležitých purinových derivátů katabolického cyklu purinu a allantoinu byla provedena pomocí elektrochemických měření. Stanovení je založeno na tvorbě komplexu purin-Cu (I) na pracovní elektrodě, kterou může být visící rtuťová kapková elektroda nebo uhlíková pastová elektroda. Rozpuštění komplexu vhodnou změnou potenciálu má za následek vznik voltametrického signálu, který je mírou obsahu purinu ve vzorku. Metoda byla optimalizována a byly naměřeny kalibrační křivky pro uvedené látky.

ABSTRACT

Electrochemical analysis of some important purine derivatives from catabolic cycle of purine, and allantoin is presented. Determination is based on the forming of purine Cu (I) complex on the mercury or carbon paste electrode. Electrochemical stripping by suitable change of potential results in voltammetric signal, which reflects purine concentration in the sample. Procedure was optimized and calibration curves were measured.

KLÍČOVÁ SLOVA

elektrochemická analýza, rozpouštěcí voltametrie, deriváty purinu, kyselina močová

KEYWORDS

electrochemical analysis, stripping voltammetry, purine derivatives, uric acid

SPRUŽINOVÁ, P. *Elektrochemická detekce purinových metabolitů a jejich isosterů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 56 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. František Jelen, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkanem FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Františku Jelenovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce. Děkuji mu rovněž za přístup a důvěru, jimiž mě vedl k samostatnosti, a za čas a ochotu, již této práci věnoval. Dále děkuji všem pracovníkům v Laboratoři biofyzikální chemie a molekulární onkologie z Biofyzikálního ústavu, v. v. i. za mnohé praktické rady, za pomoc a pozornost, kterou mi věnovali při seznamování se s metodikou práce, a v neposlední řadě pak konzultantce bakalářské práce paní Mgr. Daně Vránové, Ph.D. Rodičům děkuji za vzdělání a výchovu, jež mi s láskou poskytli, manželovi a celé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 Elektrochemické metody	7
2.1.1 Cyklická voltametrie	8
2.1.2 Pulzní voltametrie	11
2.1.2.1 Normální pulzní voltametrie	11
2.1.2.2 Diferenční pulzní voltametrie.....	12
2.1.2.3 Square-wave voltametrie.....	13
2.1.3 Rozpouštěcí voltametrie	14
2.1.3.1 Pracovní postup při rozpouštěcí analýze	15
2.1.3.2 Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie	19
2.1.3.3 Přenosová rozpouštěcí voltametrie.....	19
2.2 Purinové deriváty	20
2.2.1 Báze nukleových kyselin.....	23
2.2.2 Studované deriváty purinu	24
2.2.2.1 Kyselina močová.....	25
2.2.2.2 Xantin a hypoxantin	27
2.2.2.3 Allantoin, allopurinol a oxypurinol.....	28
2.2.3 Syntéza a odbourávání purinů	29
2.2.4 Onemocnění v důsledku dědičných defektů purinového a pyrimidinového metabolismu	30
2.3 Analytická stanovení pomocí elektrochemických metod.....	32
2.3.1 Kyselina močová	32
2.3.2 Xantin a hypoxantin	32
2.3.3 Allantoin, allopurinol a oxypurinol	33
2.4 Purinové deriváty v přítomnosti Cu(II)	33
2.4.1 Kyselina močová	33
2.4.2 Xantin	34
2.4.3 Hypoxantin	34
2.4.4 Allantoin, allopurinol a oxypurinol	34
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 Chemikálie	35
3.2 Přístroje	35
3.2.1 Visící rtuťová kapková elektroda	36
3.2.2 Uhlíková pastová elektroda	38
3.2.2.1 Příprava uhlíkové pasty a modifikované uhlíkové pastové elektrody.....	39
3.2.3 Měření koncentrace	39
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1 Stanovení kyseliny močové.....	41
4.2 Stanovení xantinu a hypoxantinu	44
4.3 Stanovení allopurinolu a oxypurinolu	46
4.4 Stanovení allantoinu	50
4.5 Stanovení kyseliny močové, xantinu a hypoxantinu ve směsi	50
5 ZÁVĚR.....	51
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	56

1 ÚVOD

Stanovení obsahu purinových derivátů ve vzorku hraje důležitou úlohu v medicínské analýze. Je to proto, že tyto látky jsou součástí nukleotidů – monomerních stavebních kamenů nukleových kyselin. Na druhé straně uměle připravené analogy purinů, jejich nukleotidů a nukleosidů se uplatňují v lékařství jako součást chemoterapie v různých lékařských oborech. Když se látka analogická přirozeně se vyskytujícím purinům zabuduje do buněčné struktury, například do nově vznikající DNA, je DNA zpravidla v organismu nefunkční. Analogy bází tak zasahují všechny dělící se buňky, tedy i buňky, které se mohou množit nekontrolovaně. Z těchto důvodů je třeba znát množství purinových derivátů v tělních tekutinách, protože jak jejich nadbytek, tak jejich nedostatek, ukazuje na vážné zdravotní problémy. Ve své práci jsem se zabývala elektrochemickými vlastnostmi purinových derivátů s cílem optimalizovat jejich stanovení v přítomnosti kationů dvojmocné mědi pomocí rozpouštěcí voltametrie.

Afinita purinových bází nukleových kyselin a mědi byla zkoumána asi před třiceti lety elektrochemicky pomocí polarografie a voltametrie na rtuťových elektrodách. Bylo zjištěno, že tyto látky spolu interagují a byl navržen možný reakční mechanismus. Analytický význam této reakce na rtuťových elektrodách byl doceněn teprve nedávno. V současné době je analytické stanovení standardně používáno pro stanovení purinových bází nukleových kyselin a stanovení oligonukleotidů, které jsou depurinovány kyselou hydrolýzou při zvýšené teplotě. Stejný postup byl navržen i pro DNA a RNA.

Ve své bakalářské práci navazuji na publikované výsledky v této oblasti. Cílem této bakalářské práce bylo rozšířit používané postupy na další purinové deriváty (nebo jejich analogy) a ukázat, že je možno jejich stanovení pomocí voltametrických metod.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Elektrochemické metody

Analýza a stanovení elektroaktivních látek může být provedena pomocí elektrochemických metod. Elektroanalytické metody patří k nejcitlivějším způsobům analytických měření, jsou přesné a levné a jejich selektivitu lze do značné míry regulovat vhodnou volbou pracovních podmínek [1]. Existuje celá řada používaných elektroanalytických metod. V Tab. 1 je ukázán jejich přehled a rozdělení podle kontrolované a měřené veličiny.

Tab. 1. Přehled elektroanalytických metod

Název metody	Vztah	Kontrolovaná veličina	Měřená veličina
Potenciometrie	$f(E, c)$	C	E
Polarografie	$f(E, I, c, t)$	c, E	$I = f(E, t)$
Voltametrie	$f(E, I, c)$	C	$I = f(E)$
Ampérometrie	$f(E, I, c)$	E	$I = f(c)$
Coulometrie	$f(E, I, Q)$	E nebo I	Q
Elektrogravimetrie	$f(E, I, m)$	E nebo I	M
Konduktometrie	$f(\gamma, c)$	C	Γ

Převzato: <http://old.mendelu.cz/~kizek/publikace/pdf/2006/Navody.pdf>

Z elektroanalytických metod jsou nejpoužívanější voltametrické metody. Podstatou voltametrických metod je měření proudové odezvy soustavy, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami, po změně polarizačního napětí. Z fyzikálně-chemického hlediska je rovnovážný systém posunut do nerovnovážného stavu a monitorováním proudu je sledován přechod systému do původního stavu. Voltametrické metody proto řadíme k dynamickým (aktivním) metodám, na rozdíl např. od potenciometrie. Často je proud monitorován jen v určitých časových intervalech, proto další důležitou veličinou je čas a voltametrické metody tak mohou být popsány jako určitá funkce napětí, proudu a času. Přehled voltametrických metod s jejich detekčními limity a tvary odezvy pro různé elektrody je uveden v Tab. 2.

Tab. 2. Vlastnosti elektroanalytických metod kontrolovaných potenciálem

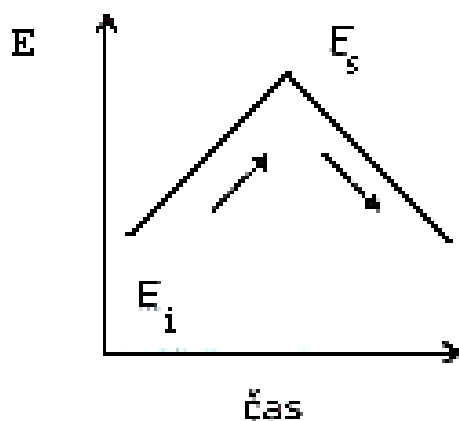
Technika	Elektroda	Detekční limit [mol/l]	Tvar odezvy
DC polarografie	DME	10^{-5}	Vlna
NP polarografie	DME	$5 \cdot 10^{-7}$	Vlna
DP polarografie	DME	10^{-8}	Pík
DP voltametrie	HMDE, pevná el.	$5 \cdot 10^{-7}$	Pík
SW polarografie	DME, pevná el.	10^{-8}	Pík
AC polarografie	DME, pevná el.	$5 \cdot 10^{-7}$	Pík
Chrono-amperometrie	HMDE, pevná el.	10^{-5}	Křivka
Cyklická voltametrie	HMDE, pevná el.	10^{-5}	Pík

Rozpouštěcí voltametrie	HMDE, filmová el.	10^{-9}	Pík
Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie	HMDE, pevná el.	10^{-9}	Pík
Adsorptivní katalytická rozpouštěcí voltametrie	HMDE, pevná el.	10^{-11}	Pík

Převzato: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EM/EM.html

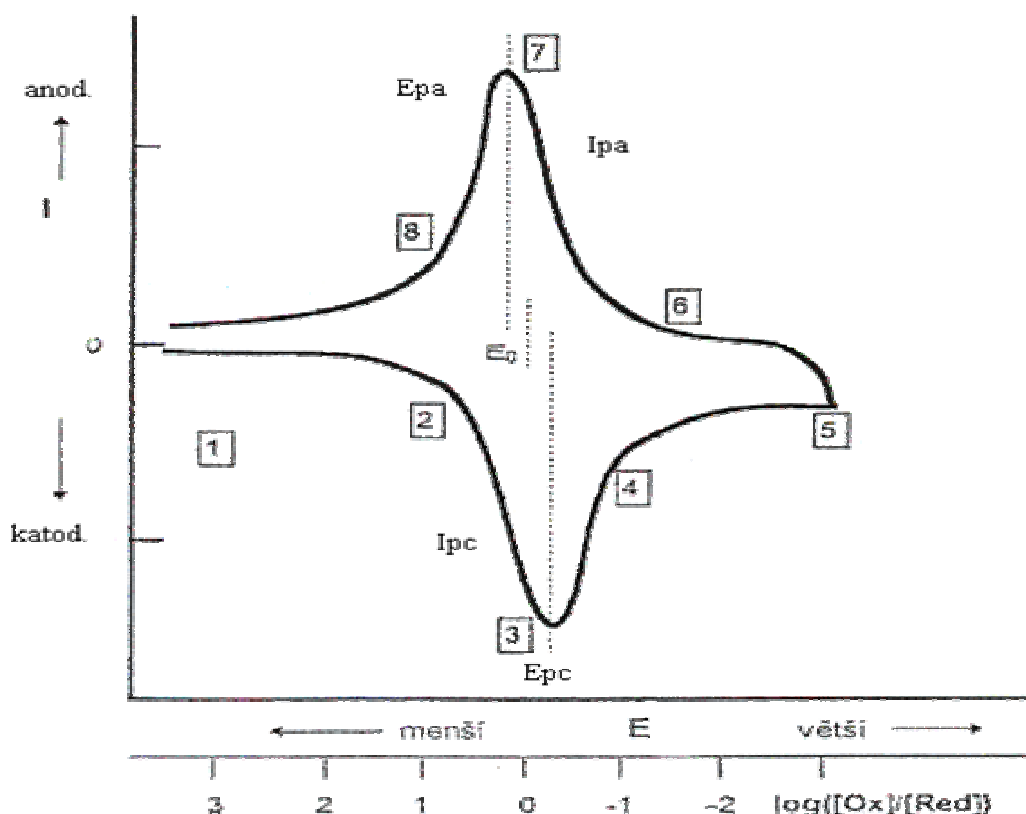
2.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je elektrochemická metoda, při které se cyklicky mění polarizační napětí elektrody a měří se výsledný proud v závislosti na tomto napětí. Z toho vyplývá, že základními nastavitelnými parametry experimentu jsou meze a rychlost posuvu potenciálu. Ovlivňovat lze rovněž vlastnosti elektrolytu, především koncentraci elektroaktivní látky a teplotu. Průběh potenciálu v čase má tvar trojúhelníku (Obr. 1).



Obr. 1. Průběh potenciálu v čase

Je-li sledovaná reakce reverzibilní, získáme signál jak na katodické, tak anodické větvi voltamogramu. Na jednoduché oxidačně-redoxní reakci je proveden rozbor modelového voltamogramu (Obr. 2).



Obr. 2. Voltametrická křivka

1 - neprobíhá žádný děj (výchozí potenciál se volí tak, aby tekł minimální proud a redukční děj neprobíhal), 2 - začíná probíhat redukční děj, proud narůstá a oxidovaná forma se postupně uspořádává, 3 - maximum proudu I_{pc} při charakteristickém potenciálu E_{pc} , oxidovaná forma před elektrodou je spotřebována, 4, 5 - pokles proudu – málo látky k dispozici pro redukci – mění se směr potenciálu, ale redukční děj ještě stále pokračuje, 6 - nárůst potenciálu působí oxidaci redukované formy nahromaděné před elektrodou objevuje se anodický proud, postupně narůstá, 7 - maximum anodického proudu I_{pa} při potenciálu E_{pa} , 8 - pokles anodického proudu s vyčerpáváním redukované formy, návrat do výchozího stavu.

Výsledkem je katodicko-anodická křivka. Při reverzibilní jendoelektronové elektrodové reakci se získá stejně vysoký katodický i anodický pík (posun o 57 mV). Při vzrůstající ireverzibilitě děje se píky od sebe vzdalují, jeden z nich postupně vymizí. Ze vzdálenosti píků lze určit rychlostní konstantu elektrodového děje [2, 3].

Vnucený elektrodový potenciál kontroluje poměr koncentrací daného redoxního páru podle **Nernstovy** rovnice (1).

$$E = E^0 + R \cdot T / n \cdot F \cdot \ln a_{ox} / a_{red} \quad (1)$$

kde E elektromotorické napětí,
 E^0 standardní elektromotorické napětí,
 R univerzální plynová konstanta ($R=8,314$),
 T teplota (K),
 n počet vyměňovaných iontů,
 F Faradayova konstanta, ($F=96487$ C/mol),
 a_{ox} aktivita oxidované formy
 a_{red} aktivita redukované formy

Výška signálu je přímo úměrná koncentraci stanovované látky v roztoku. Pro případ difúze k rovinné elektrodě je proud v píku dán **Randles-Ševčíkovou** rovnicí (2)
(pro $t = 25$ °C platí):

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c_{ox}^0 \cdot v^{1/2} \quad (2)$$

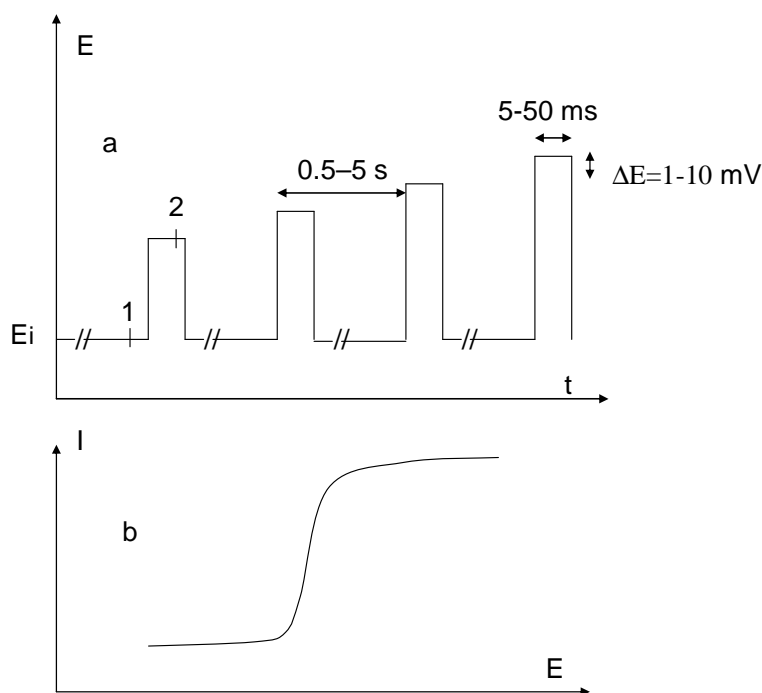
kde I_p zde proud v ampérech,
 A plocha elektrody v cm^2 ,
 D difúzní koeficient oxidované formy v roztoku je v cm^2/s ,
 v rychlost polarizace ve V/s a c_{ox}^0 v mol/cm^3 [3].

2.1.2 Pulzní voltametrie

U pulzní voltametrie je základním polarizačním prvkem napěťový pulz. Elektroda je polarizována řadou časově a napětově definovaných pulzů a proud je snímán před vložením pulzu a ke konci každého pulzu. Diference snímaných hodnot proudu jsou vynášeny proti polarizačnímu napětí. Tento způsob měření eliminuje vliv kapacitního proudu, který po aplikaci pulzu klesá rychleji než proud faradický, a ke konci pulzu je zanedbatelný. Zavedení pulzních metod přineslo značné zvýšení citlivosti u analytických aplikací [2, 3]. Pulzní metody mají řadu variant, z nichž nejpoužívanější jsou diferenční pulzní voltametrie (DPV), normální pulzní voltametrie (NPV) a square-wave voltametrie (SWV).

2.1.2.1 Normální pulzní voltametrie

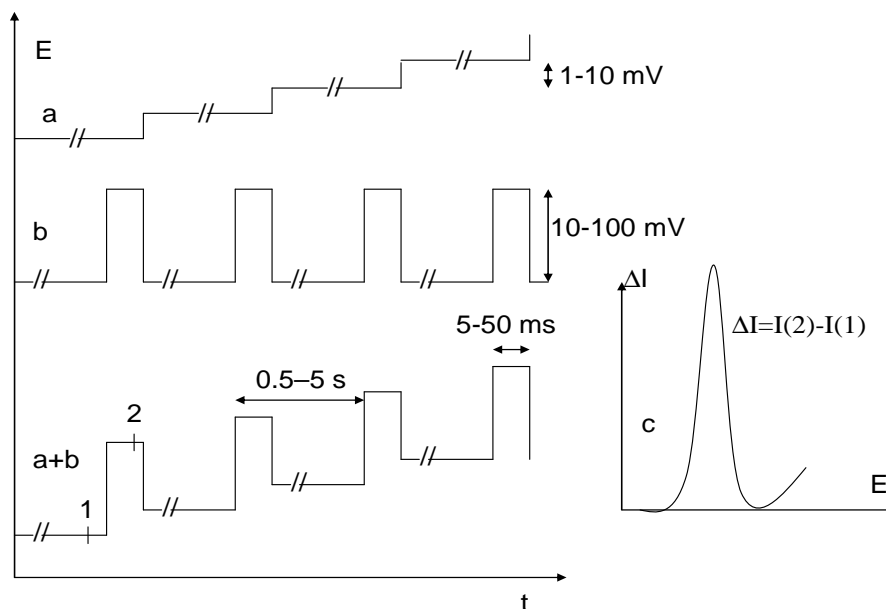
Při normální pulzní voltametii (NPV) je potenciál elektrody nastaven na počáteční hodnotu E_i , při které neprobíhá faradická reakce. Krátké potenciálové pulzy jsou vkládány s rostoucí amplitudou, přičemž přírůstek amplitudy je konstantní. Proud je snímán ke konci každého pulzu. Schéma polarizace elektrody a proudové odezvy je na Obr. 3. Voltamogram má tvar klasické polarografické vlny.



Obr. 3. Normální pulzní voltametrie. a) schéma vkládání pulzů při počátečním potenciálu E_i . Proud je snímán ke konci každého pulzu, a proud při E_i je považován za nulový. b) schematický tvar I - E závislosti.

2.1.2.2 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) se liší od NPV následovně: a) potenciálová rampa se mění mezi vkládáním pulzů lineárně, b) proud je snímán těsně před vložením pulzu a těsně před jeho ukončením. Pulzy jsou stejně veliké a difference proudů jsou ukládány a vynášeny proti lineárnímu napětí (Obr. 4).

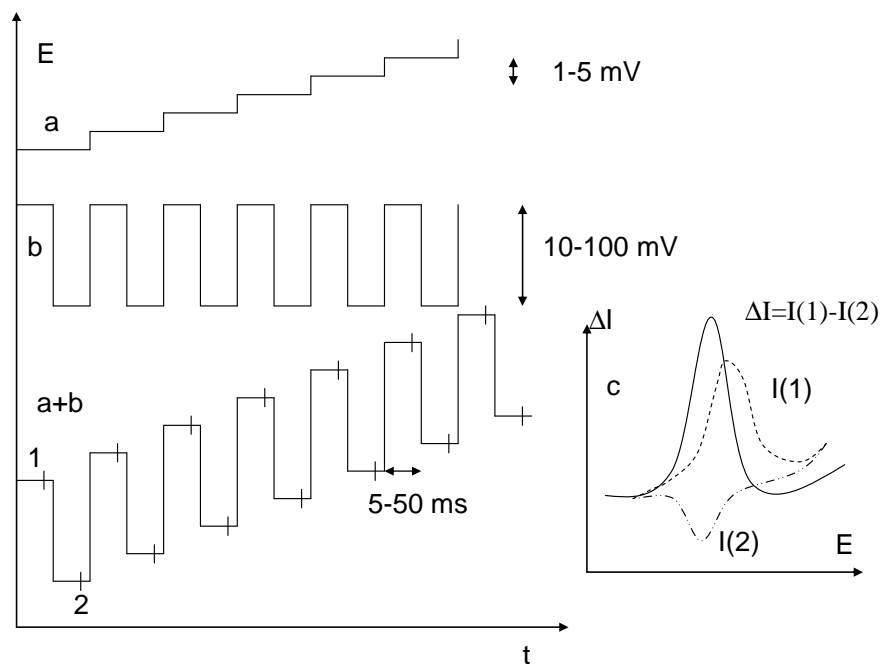


Obr. 4. Diferenční pulzní voltametrie. a,b) schéma polarizačních napětí a jejich skládání. c) schematický tvar I - E závislosti

Protože DPV je diferenční technika, je odezvou elektrodového děje voltametrická křivka ve tvaru píku, který představuje první derivaci konvenční voltametrické křivky.

2.1.2.3 Square-wave voltametrie

Polarizační schéma u square-wave voltametrie (SWV) je následující: pravoúhlé napěťové pulzy jsou synchronně skládány s lineárním napětím a proud je snímán v bodech 1 a 2. Ve srovnání s NPP a DPV je efektivní polarizační rychlost vyšší, a může dosahovat až 1 V/s. Protože proud je snímán jak po pozitivním, tak negativním směru polarizace, je možno v jednom experimentu získat píky odpovídající oxidaci i redukci elektroaktivní látky. Zpravidla je registrován výsledný voltamogram jako rozdíl obou píků (Obr. 5).



Obr. 5. Square-wave voltametrie. a,b) schéma polarizačních napětí a jejich skládání. c) schematický tvar I - E závislosti.

Jedná se o variantu voltametrie se superponovanou pravoúhlou složkou napětí. Metoda je mnohem citlivější než polarografie se sinusovou složkou napětí v důsledku potlačení nabíjecí komponenty měřeného proudu. Získaný měřený signál má tvar píku. Mez stanovitelnosti pro reverzibilní systémy činí asi $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l, pro ireverzibilní systémy asi 10^{-6} mol/l. Metodou SWV lze rovněž měřit tenzametrické křivky.

2.1.3 Rozpouštěcí voltametrie

Metoda rozpouštěcí voltametrie je známa pod různými názvy – inverzní voltametrie, elektrochemická rozpouštěcí analýza (ERA), anodická nebo katodická stripping voltametrie (ASV, CSV) nebo stripping analýza [4-6].

Metoda spojuje předběžné nahromadění stanovované látky na povrchu elektrody s následným voltametrickým měřením množství vyloučeného produktu. Rozpouštěcí voltametrie takto umožňuje dosáhnout zvýšení citlivosti až o několik řádů koncentrace. Výhodné je provádět zakoncentrování analytu elektrolyticky. K provedení rozpouštěcího kroku lze použít jakékoliv elektrochemické techniky.

Nejčastěji se využívá polarografie nebo voltametrie s lineární změnou potenciálu. Obvykle je zde nutné vyhnout se použití povrchově aktivních látek. Použití nestacionární elektrochemické techniky ke sledování rozpouštěcího procesu vede ke zvýšení citlivosti stanovení. Obvykle se vyloučí jen malá frakce sledované látky z roztoku, při práci s malými objemy však lze pracovní podmínky upravit tak, aby došlo k úplnému vyloučení analytu. Přesnost a správnost metody bývá velmi dobrá a často lze jediným měřením stanovit několik látek současně. U všech metod stopové analýzy je třeba vyloučit kontaminaci používaných chemikálií, vody a potlačit adsorpci analytů na stěny nádoby [7].

Stanovení elektroaktivních složek směsi se provádí nikoliv při jejich vylučování na polarizovatelné elektrodě, ale naopak při jejich elektrolytickém rozpouštění. Roztok se upraví přidávkou nosného elektrolytu a odstraní se z něj kyslík. Rozpouštěcí voltametrie probíhá ve třech krocích:

- 1) Při elektrolytickém nahromadění se vylučují stanovované látky na elektrodě. Provádí se za intenzivního míchání při konstantním potenciálu odpovídajícím limitnímu proudu stanovované látky, který je volen tak, aby elektrodová reakce probíhala dostatečně rychle. Ionty se dostávají k povrchu elektrody konvektivní difuzí, a proto je limitní proud podstatně vyšší než v nemíchaném roztoku. Nahromadění se nechá probíhat takovou dobu, která závisí na obsahu stanovované složky v roztoku. Řádově jde o desítky sekund až desítky minut. Pro práci lze použít běžné polarografické vybavení s vhodnou pracovní elektrodou. Jako polarizovatelná elektroda se používá stacionární rtuťová elektroda, případně elektrody z tuhých materiálů (uhlík, platina, zlato), a to zejména elektrody uhlíkové a platinové (stacionární v míchaném roztoku, anebo rotující). Pro zlepšení citlivosti a selektivity lze použít tenkovrstvé filmové rtuťové elektrody. Velmi vhodné je in-situ vyloučení rtuti na elektrodě z impregnovaného grafitu nebo skelného uhlíku. Pomocná elektroda bývá z platiny, srovnávací elektroda kalomelová.
- 2) Míchání se vypne a proud rychle klesne na úroveň odpovídající stacionárnímu limitnímu difuznímu proudu. Dochází k nezbytnému ustálení roztoku. Případně je možno elektrolyt vyměnit.
- 3) Elektrolytické rozpouštění (stripping) nahromaděných produktů elektrolýzy se zahájí lineární změnou potenciálu a zaznamenává se rozpouštěcí polarografická vlna, ovšem v opačném směru. Následovně získaná rozpouštěcí křivka má tvar píku. Potenciál vrcholu píku je charakteristický pro daný analyt. Výška píku (plocha píku) odpovídá množství vyloučené látky. Použijeme-li při tom diferenční pulzní metodu, při které se vkládají záporné obdélníkové pulzy, získáme jako polarogram soustavu píků, kde souřadnice vrcholů na ose potenciálu určují kvalitu a plochy píků určují kvantitu.

Na běžné rtuťové kapce se mohou vylučovat kovy, které tvoří amalgám (Zn, Cu, Pb, Cd, Tl, In, Bi, Sn a Ga). Jiné kovy mohou být koncentrovány na rtuti adsorpcí (například Ni, Co a Fe). Akumulace kovu na tuhé elektrodě se může vytvářet v podobě filmu (např. stanovení rtuti). Další depozice na povrchu elektrody by mohla probíhat v podobě málo rozpustné sloučeniny (např. AgCl). Použití je možné nejen pro stanovení kovů, ale i některých organických látek a chelátů, také pro stanovení biologicky významných látek, které lze nahromadit na elektrodě při vhodném potenciálu rovněž adsorpcí (adsorptivní rozpouštěcí voltametrie), nebo látek, které lze nahromadit anodicky za vzniku nerozpustných produktů (halogenidy a sulfidy rtuťné). Zajímavou technickou aplikací je tribodiagnostika, kterou se stanovují otěrové kovy (Cu, Cd, Pb, Zn) v mazacích olejích po jejich extrakci do kyseliny chlorovodíkové. Z výsledku usoudíme, zda je olej nutno vyměnit, případně vyhodnotíme stav motoru. Rozpouštěcí voltametrie je nejcitlivější elektrochemická metoda. Běžně stanovujeme látky o koncentracích 10^{-8} mol/l. Ve stopové analýze lze stanovit látky koncentrace až 10^{-12} mol/l, což tuto metodu citlivostí přibližuje atomové spektrální analýze [6].

Při stanovení Pb, Zn, Cd v pitné vodě se pro zkoncentrování analyzu využívá extrakce. Nejsou neznámé i případy zkoncentrování analytu pomocí iontové výměny (iontoměniče) [7].

2.1.3.1 Pracovní postup při rozpouštěcí analýze

Volba typu elektrody

Tato volba je již předem ovlivněna typem reakce použité pro předběžné nahromadění. Máme-li stanovit těžký kov, bude pravděpodobně nejvhodnější stacionární rtuťová elektroda a pro nahromadění se využije tvorby amalgamu. Pro který typ stacionární rtuťové elektrody se rozhodneme, bude záviset na koncentraci stanovované látky, na složení vzorku, požadované přesnosti, nebo na tom, potřebujeme-li stanovit současně více látek.

Volba složení základního elektrolytu

Při volbě základního elektrolytu musíme respektovat několik podmínek:

V roztoku musí být dostatečná koncentrace vodivých částic, aby nedocházelo k velkému ohmickému úbytku napětí, aby se potlačily migrační proudy a dosáhlo se konstantní hodnoty aktivitních a difúzních koeficientů. Z tohoto hlediska jsou nejvhodnější roztoky minerálních kyselin, hydroxidů, minerálních solí, apod.

Použité složky základního elektrolytu musí být dostupné v dostatečné čistotě nebo se nečistoty musí vhodným způsobem odstranit.

Složení základního elektrolytu se má volit tak, aby se dosáhlo co největší citlivosti a selektivity stanovení. Obecně platí, že citlivost je vyšší, jsou-li elektrodové reakce stanovované látky reverzibilní. Kromě toho u reverzibilních systémů je hodnota $E_{p/2}$ téměř rovna půlvlnovému potenciálu a proto ji lze předem odhadnout z voltametrických dat. S klesající rychlostí reakce přenosu náboje klesá měřený signál, a to zejména u metod se střídavým signálem, a hodnota $E_{p/2}$ se posunuje ke kladným hodnotám. Rovněž selektivita se zhoršuje, neboť se píky rozšiřují. Nekomplexotvorné základní elektrolyty zřídka umožňují dostatečně selektivní stanovení, s výjimkou analýz čistých roztoků, některých analýz vod

apod. Selektivitu lze mnohdy podstatně zlepšit použitím vhodného komplexotvorného činidla, kterým se vlny přítomných depolarizátorů posunou na potenciálové ose v závislosti na stabilitě vznikajících komplexů, jejich složení a koncentraci komplexotvorného činidla. V některých případech je rovněž výhodná výměna roztoku, např. jsou-li v roztoku přítomny složky, které by rušily stanovení svou elektrodovou reakcí, svou povrchovou aktivitou, nebo kdyby docházelo k deformacím píků následkem rozkladu základního elektrolytu, rozpouštěním rtuťové elektrody apod. Je tedy možno provést např. nahromadění v nekomplexotvorném prostředí a rozpouštění v komplexotvorném prostředí, popř. naopak. Při volbě základního elektrolytu je rovněž třeba mít na paměti, že hodnota iontové síly, tedy množství soli v roztoku, má vliv na hodnotu voltametrického proudu a do určité míry i na hodnotu půlvlnového potenciálu. Obecně platí, že se vzrůstající koncentrací solí v roztoku výška měřených voltametrických píků klesá, zvláště při použití metod se střídavým signálem. Musíme pamatovat i na vliv povrchově aktivních látek. Obecně je možno říci, že se vzrůstající koncentrací povrchově aktivních látek klesá citlivost stanovení. V některých případech se však mohou povrchově aktivními látkami maskovat rušivé složky roztoků, a to potlačením jejich elektrodových reakcí [4].

Volba potenciálu předběžného nahromadění

Z teoretického hlediska je možno určit potřebný potenciál elektrolýzy na základě znalosti příslušného půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ v daném prostředí. Je však třeba si uvědomit, že $E_{1/2}$ odpovídá přibližně rovnovážnému potenciálu, jsou-li si koncentrace v roztoku a v amalgamu rovny. Při rozpouštěcím stanovení však vzhledem k nahromadění je koncentrace kovu v amalgamu mnohem větší než v roztoku, a potenciál se proto posune na katodickou stranu obecně o $(0,059/n)$ V při každém snížení poměru těchto koncentrací o jeden řád. Předpokládáme-li asi stonásobné až tisícinásobné zvýšení koncentrace kovu v amalgamu při elektrolýze, musíme zvolit potenciál E_{el} přibližně o $(0,2/n)$ V zápornější než je odpovídající $E_{1/2}$.

Při zkoumání podmínek pro stanovení je nejúčelnější ověřit experimentálně vliv E_{el} na výšku píku a zvolit ho v oblasti, v níž se již dosáhne maximální hodnoty I_p , ale v níž neprobíhají další vedlejší reakce (rozklad základního elektrolytu, popř. vylučování dalších rušících prvků). Experimentálně získané závislosti mají obvykle limitující charakter, často se při dalším posunu E_{el} k záporným hodnotám pík opět snižuje, neboť vlivem probíhajících reakcí (vývin H_2) se sníží proudová účinnost. Pokud je analyzována směs několika prvků nebo pokud se musí stanovit ušlechtilější prvek v nadbytku prvku méně ušlechtilého, je možné vhodnou volbou E_{el} dosáhnout i účinného oddělení. V některých případech je nutno E_{el} kontrolovat potenciostatem.

Na tuhých elektrodách a v těch případech, kdy nahromaděním vznikají povrchové filmy, je třeba potenciál elektrolýzy volit na základě experimentálně získaných závislostí, protože často dochází k přepětí či podpětí. Zvolený E_{el} se musí kontrolovat a udržovat na konstantní hodnotě, nejlépe opět pomocí tříelektrodového systému a potenciostatu [4].

Volba doby předběžného nahromadění

Citlivost stanovení lze zvyšovat prodlužováním doby elektrolýzy τ . Pokud má platit přímá úměrnost mezi nahromaděným množstvím a dobou elektrolýzy, nesmí být doba elektrolýzy

příliš dlouhá, aby znatelně neklesla koncentrace sledované látky v roztoku. Přímá úměrnost mezi vyloučeným množstvím látky a dobou elektrolýzy není ovšem při rozpouštěcím stanovení nutná; jak při metodě kalibrační křivky, tak i při metodě standardního přídávku je jedinou podmínkou, aby doba a ostatní podmínky elektrolýzy byly stejné při všech měřeních. Účinnost elektrolýzy s prodlužováním doby trvání klesá, a proto se většinou neosvědčily elektrolytické časy delší než asi 1 hodina. U elektrod tvořených rtuťovou kapkovou visící nebo ležící elektrodou se rovněž projeví difúze vylučovaného kovu do kapiláry (zpětná difúze).

Pro běžná měření s visící rtuťovou kapkou bývají potřebné doby elektrolýzy zhruba 5 min pro 10^{-6} M až 10^{-7} M roztoky, asi 15 min pro 10^{-8} M roztoky a asi 60 min pro 10^{-9} M roztoky. Pro vylučování látek na tuhých elektrodách se někdy používá i delší elektrolýzy.

Pokud se stanovení provádí ve velmi malém objemu roztoku (řádově setin ml), lze dosáhnout stavu, při kterém nastane úplné vyčerpání roztoku po velmi krátké době elektrolýzy (řádově jednotek minut). Nevýhodou tohoto postupu jsou velké nároky na přesnost odměřování velmi malých objemů roztoků, výhodou je malá spotřeba látek a nepříliš vysoké požadavky na reprodukovatelnost elektrolýzy, pokud se používá přiměřeně dlouhá doba elektrolýzy, aby se sledovaná látka kvantitativně vyloučila.

Volba metody sledování rozpouštěcího procesu

Na rozdíl od prvního kroku, tj. nahromadění stanovované látky elektrolýzou, které se provádí nejlépe za konstantního potenciálu, je volba metody sledování rozpouštěcího procesu složitější. Je zřejmé, že při drtivé většině rozpouštěcích stanovení se používá ke sledování rozpouštěcího procesu voltametrie s lineární změnou potenciálu. Hlavní předností této metody je to, že lze použít moderních komerčních potenciostatů, s dvouelektrodovým nebo tříelektrodovým zapojením. I teoreticky je tento postup nejlépe propracován a v praxi byl nescíslněkrát prověřen z nejrůznějších hledisek, o čemž svědčí i počet prací věnovaných tomuto problému.

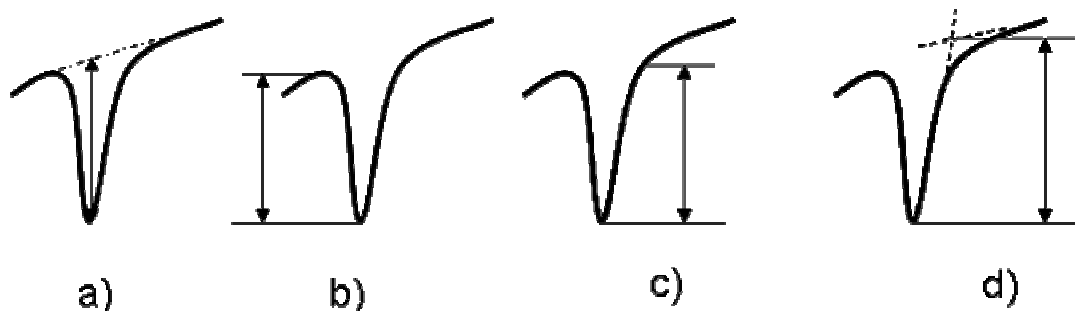
Nevýhodou této metody je poměrně malá rozlišovací schopnost a potom nepříznivý vliv nabíjecího proudu, který se projevuje zvláště při stanovení velmi malých množství látek tím, že deformuje rozpouštěcí píky a snižuje přesnost odečítání jejich výšky.

Z metod založených na chronopotenciometrii, chronoamperometrii a coulometrii se podle dosud uveřejněných prací zdají nejvhodnější metody využívající chronopotenciometrického uspořádání. Tato metoda poskytuje často reprodukovatelnější výsledky a citlivost stanovení je obdobná nebo dokonce poněkud větší než u voltametrie s lineární změnou potenciálu. Dobrých výsledků bylo dosaženo se rtuťovými elektrodami. Použije-li se však tuhé elektrody (např. grafitové), není v některých případech při malých proudech rozpouštěcí křivka E-t dostatečně strmá po ukončení rozpouštění.

I když metody se superponovaným střídavým napětím se zatím používaly pro sledování rozpouštěcího procesu spíše výjimečně, zdají se být perspektivní. Ovšem nevýhodou metod se superponovaným střídavým napětím je, že jsou citlivé na povrchově aktivní látky a že se nepříznivě projevuje ireverzibilita elektrodových procesů. Vzhledem k tomu, že jsou stále zveřejňovány nové poznatky o různých měřicích technikách a že zatím chybí komplexnější srovnání, nelze činit obecnější závěry o přednostech té které metody.

Vyhodnocení rozpouštěcích křivek

Na většině zaznamenaných závislostí se na křivce získají píky. Dostatečnou přesnost při vyhodnocení poskytne obvykle měření jejich výšky. Může se to provést kterýmkoliv ze způsobů znázorněných na Obr. 6., ale potom se musí v dané sérii pokusů měřit výška stále stejně. Všechny čtyři uvedené způsoby jsou přibližně stejně přesné, ale celkový tvar křivky může vést k přednostnímu použití určitého způsobu (např. zešikmená křivka, těsná blízkost proudů odpovídajících reakcím základního elektrolytu nebo jiných prvků).



Obr. 6. Metody měření výšky píků

Chyby vzniklé při měření výšky deformovaných píků, které leží blízko sebe, mohou snadno přesáhnout 10 %. Gutknecht a Perone [8] popsali metodu na rozlišení překrývajících se píků při voltametii se stacionárními elektrodami pomocí malého digitálního počítače připojeného k měřicímu přístroji. Odvodili empirickou rovnici polarizační křivky odpovídající širokému spektru elektroaktivních látek a tuto rovnici porovnali se standardními křivkami. Konstanty v této rovnici se stanoví pro různé látky a uchovávají se v knihovně programů. Při analýze složité polarizační křivky se pak tyto konstanty používají k regeneraci standardních křivek, které se porovnávají s jednotlivými složkami složitého signálu. Tato metoda je značně účinná (lze kvantitativně rozlišit překrývající se křivky s rozdílem E_p menším než 40 mV), ovšem je poměrně náročná na čas i vybavení.

Při analýze směsí, při níž je na křivce několik píků blízko sebe a není možné je rozlišit volbou vhodného základního elektrolytu nebo potenciálu elektrolýzy, se osvědčilo též „stechiometrické rozpouštění“, při němž se po dosažení vrcholu negativnějšího píku zastaví posun potenciálu a vyčká se až se negativnější prvek kompletně rozpustí a jeho proud klesne k nule, popř. na hodnotu zbytkového proudu [9], a tak neruší další stanovení.

Při rozpouštění povrchových povlaků by se měly podmínky zvolit tak, aby rozpouštění bylo vždy úplné, a to nejen při metodách coulometrických a potenciostatických, ale i při nejběžnější voltametii s lineární změnou potenciálu. Vzhledem k tomu, že píky při rozpouštění povlaků mají poněkud odlišný tvar (jsou nesymetrické), a také proto, že přímá úměrnost platí přesně pouze mezi množstvím látky na elektrodě a plochou píku, je potom vyhodnocení píku měřením jeho výšky pouze aproximací a ve všech případech, v nichž je možno předpokládat, že vzniklý povlak tvoří méně než monovrstvu, by se měla měřit plocha píku.

Rovněž u deformovaných, širokých a plochých píků při rozpouštění amalgamů je lépe měřit plochu píku než jeho výšku. Plochu píku lze stanovit např. planimetrováním (pomocí běžných planimetrů) nebo vystřížením a vážením (po srovnání s hmotností změřené plochy

téhož papíru). Obě metody jsou poměrně pracné a jejich přesnost značně kolísá podle zručnosti a pečlivosti pracovníka a podle podmínek (např. změny homogenity a vlhkosti papíru při vážení). Mnohem přesnější je přímá integrace měřeného signálu, např. elektronickými integrátory; mezení je však v tom, že tak nelze analyzovat směsi, neboť získáme pouze celkový náboj odpovídající celé polarizační křivce. Při elektronické integraci je také nutno odečítat náboj odpovídající vedlejším reakcím [4].

2.1.3.2 Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie

Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie neboli adsorptivní stripping voltametrie (AdSV) je modifikací rozpouštěcí voltametrie. Liší se od ní způsobem akumulace analytů na pracovní elektrodě. Akumulace nastává adsorpcí při vhodně zvoleném potenciálu. Eak po akumulační čas tak. Řada organických látek je povrchově aktivních a je schopna adsorpce na fázovém rozhraní elektroda-roztok.

Adsorpce samostatných kovových iontů nenastává, ale je možné je vázat do adsorbovatelných komplexů s vhodnými činidly (např. nikelnaté ionty-diacetyldioxim). Nemusí být využívány pouze elektrostatické přitažlivé síly a síly fyzikální adsorpce. Selektivitu metody lze řídit vhodnou modifikací povrchu pracovní elektrody, který pak může vázat určité typy analytů na základě chemické interakce.

Jako pracovní elektrodu používáme stacionární rtuťovou kapku, která má výhodu snadno obnovitelného povrchu. Různě modifikovat lze uhlíkové pastové elektrody.

Modifikace se provádějí:

- pokrytím povrchu tenkou vrstvou nízkomolekulárních látek
- pokrytím povrchu vrstvou polymerního filmu
- přimícháním modifikátoru do celého materiálu elektrody.

Použijeme-li organické pojivo, je možno využít i extrakce analytu ze zkoumaného roztoku do tohoto pojiva. U těchto elektrod je obtížnější obnovit jejich povrch.

Při rozpouštění se aplikuje obvykle diferenční pulzní pokles potenciálu. Ve voltamogramu dostáváme píky faradické (nastává oxidace nebo redukce akumulovaného analytu) nebo nefaradické (desorpce akumulovaného analytu).

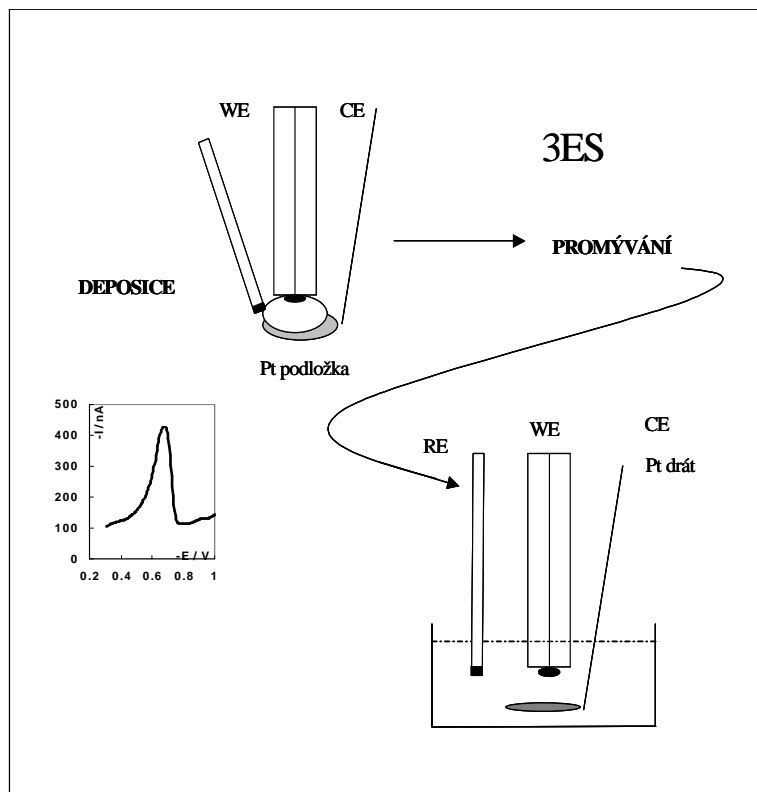
Metoda AdSV je použitelná pro látky, které se v základním elektrolytu špatně rozpouští a mají elektroaktivní funkční skupiny. Uplatňuje se při stanovení různých biologicky aktivních látek (léčiva, pesticidy, růstové stimulanty, vitamíny) a kationtů kovů vázaných do vhodných komplexů. Běžně pracujeme s citlivostí do 10^{-9} , nejméně až 10^{-12} mol/l [6].

2.1.3.3 Přenosová rozpouštěcí voltametrie

V případě biologických makromolekul (vedle nukleových kyselin též např. proteinů) je adsorpce na povrch rtuťové (a grafitové) [10] elektrody natolik stabilní, že lze mluvit o imobilizaci makromolekul na elektrodovém povrchu a o elektrodách modifikovaných nukleovými kyselinami [11-13]. Elektrodu s adsorbovanou vrstvou nukleových kyselin je možno opláchnout a přenést do nádobky s čistým (tj. nukleové kyseliny neobsahujícím) základním elektrolytem (Obr.7). Pomocí libovolné elektroanalytické metody pak lze získat signály nukleových kyselin, které se jen málo liší od signálů naměřených „konvenční“ metodou (tj. v přítomnosti analyzované látky v základním elektrolytu během měření). Tento

postup je obvykle označován jako adsorptivní přenosová potenciometrická rozpouštěcí analýza (AdTSV).

Elektrody modifikované nukleovými kyselinami je možno opakovaně polarizovat, případně vkládat opakované potenciálové cykly [13, 14]. Protože se nukleové kyseliny na HMDE účinně adsorbují v širokém potenciálovém rozmezí, je možno elektrodu modifikovanou nukleovými kyselinami připravit prostým ponořením HMDE (při otevřeném proudovém obvodu) do roztoku nukleové kyseliny.



Obr. 7. Schéma přenosové rozpouštěcí techniky s adsorptivním nahromaděním na Pt podložce.

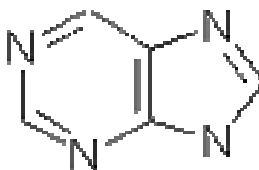
K této operaci postačuje kapka roztoku NK objemu 4-5 μ l, zatímco k provedení konvenčního voltametrického měření je při běžném přístrojovém vybavení potřeba okolo 1 ml roztoku. Požadovaný objem je tedy díky AdTSV redukován více než o dva řády, což při využití adsorptivní prekoncentrace umožňuje snadno analyzovat subnanogramová množství nukleových kyselin. Tato skutečnost dovoluje elektrochemickou analýzu takových vzorků, se kterými nebylo dosud možno pracovat ve velkém rozsahu pro náročnost jejich přípravy či z ekonomických důvodů (specifické RNA, fágové RNA a DNA, plasmidové DNA včetně topoizomerů a rekombinantních molekul, syntetické oligonukleotidy) [15].

2.2 Purinové deriváty

Protože deriváty purinu jsou významné, celá skupina těchto chemicky si podobných látek se nazývá puriny. Purinové metabolity představují významnou skupinu látek, které se účastní téměř všech biochemických reakcí. Purinové a pyrimidinové nukleotidy tvoří základní

stavební složky nukleových kyselin a jsou také součástí řady koenzymů. Nukleosidtrifosfáty (zejména ATP) představují zdroj energie pro buňku. Důležitost těchto látek v metabolismu buňky potvrzuje zjištění, že lidský organismus syntetizuje všechny potřebné nukleotidy z nenukleotidových prekursorů (tzv. syntéza de novo) a nespolehá na jejich exogenní přísun stravou. Téměř všechny buňky používají tuto metabolickou cestu a kromě toho přeměňují též volné báze zpětně na příslušné nukleotidy recyklační dráhou. Též různorodost klinických projevů spolu s postižením mnoha důležitých orgánů u genetických defektů purinového metabolismu ukazuje na význam této skupiny látek.

Puriny jsou odvozené od purinového skeletu (Obr. 8), který se skládá z šestičlenného pyrimidinového jádra kondenzovaného s pětičlenným jádrem imidazolovým.



Obr. 8. Struktura purinu

Z hlediska chemické struktury složek nukleových kyselin rozlišujeme báze, nukleosidy a nukleotidy. Báze jsou deriváty purinu, tedy heterocyklické, aromatické molekuly. Hlavní purinové báze nukleových kyselin jsou adenin a guanin. Spojením bází s cukernou složkou vznikají nukleosidy, které jsou lépe rozpustné ve vodě než volné báze. Fosforečné estery nukleosidů jsou nukleotidy. V ribonukleotidech je cukernou složkou zbytek D-ribózy. V deoxyribonukleotidech tvoří cukernou složku 2'-deoxy-D-ribóza. Nukleotidy jsou středně silné kyseliny. Puriny jsou součástí dědičné informace každé buňky, a proto se vyskytují téměř ve všech rostlinných a živočišných potravinách v různém množství. Živočišné potraviny obsahují zpravidla více purinů než rostlinné, i naproti tomu, že rostlinné potraviny disponují menším množstvím buněčných jader. Některé rostliny tvoří methylované xanthiny, alkaloidy, které mají účinek na centrální nervovou soustavu. Nejvýznamnější je kofein, obsažený v kávě, theofyllin, obsažený v čaji, a theobromin, z kaka a čokolády.

Kyselina močová je přirozeným konečným produktem při odbourávání purinů v lidském těle, které jsou obsaženy v buněčných jádrech (endogenní puriny), a purinů, které jsou přijímány potravou a vznikají při látkové přeměně (exogenní puriny).

Mezi pokrmy a potraviny nevhodné, s vysokým obsahem purinů, patří:

- kořenící směsi a koncentráty: Maggi, sojová omáčka, masové kostky
- maso a masné výrobky: nakládaná masa, uzeniny, masa mladých zvířat (telecí, jehněčí, kuřecí)
- ryby a rybí výrobky: sardelová pasta, očka, olejovky, šproty, rybí konzervy, nakládané ryby
- ostatní: obilniny a celozrnné výrobky, luštěniny, droždí, čokoláda, kakaový prášek, špenát, reveň, červená řepa, fíky
- vnitřnosti: brzlík, játra, ledvinky, mozeček, plíce, slezina, kostní morek, krev, játrové paštiky, jaternice, jaternicové polévky.

V běžné stravě je třeba vybírat ty potraviny, jejichž obsah purinů je nízký. Hodnoty obsahu purinů jsou uvedeny v Tab.3.

Tab. 3. Obsah purinů v potravinách

Potraviny	Obsah purinů (mg/100g)	Potraviny	Obsah purinů (mg/100g)
Maso, uzeniny		Celozrnný chléb	14
Hovězí	40	Bílé pečivo	8
Telecí	40	Ovesné vločky	30
Vepřové	48	Brambory, luštěniny, zelenina	
Skopové	46	Brambory	6
Kuřecí	40	Čočka	70
Králičí	38	Hrách	45
Zvěřina	35-39	Fazole	44
Šunka	24	Celer	10
Anglická slanina	25	Cibule	1
Vnitřnosti		Fazolové lusky	5
Játra	95	Zelený hrášek	80
Ledvinky	80	Chřest	14
Jazyk	55	Kapusta	6
Telecí brzlík	400	Kedlubny	5
Ryby		Květák	10
Kapr	54	Mrkev	2
Losos	22	Okurky	3
Pstruh	56	Pór	3
Sardinky	120	Rajčata	4
Sleď	69	Reveň	4
Štika	48	Ředkvičky	6
Mléko, vejce		Řepa červená	5
Mléko	1	Salát hlávkový	5
Vejce	2	Špenát	23
Bílek	1	Zelí bílé	5
Žloutek	5	Zelí červené	8
Tuky, ořechy, kakao		Houby	5
Kakaový prášek	1900	Ovoce	
Mandle	9	Borůvky	2
Lískové ořechy	10	Hrušky	1
Vlašské ořechy	8	Jablka	1
Pekárenské výrobky		Jahody	5

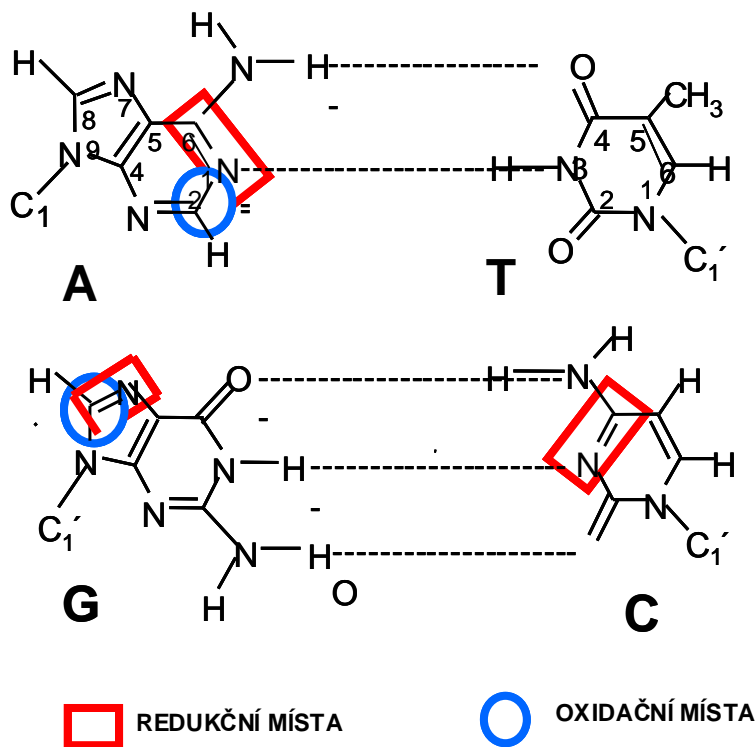
Převzato z: <http://celostnimedicina.cz/dna-a-dieta.htm> (Hodnoty purinů převzaty z Oddělení klinické výživy Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze).

2.2.1 Báze nukleových kyselin

DNA spolu s RNA tvoří nukleové kyseliny (NK). NK jsou vlastní prostetickou skupinou nukleoproteinů. NK jsou složité látky polymerního charakteru tvořící obrovskou molekulu vláknitého tvaru. Jakožto polymer se každá NK skládá ze čtyř analogických základních jednotek – monomerů, které nazýváme nukleotidy. Je tedy NK polynukleotid, což znamená, že je složena z mnoha nukleotidů navzájem složených v dlouhé řetězce, jehož rozštěpením na základní jednotky vznikají mononukleotidy. Každý mononukleotid má tři složky:

- **kyselinu trihydrogenfosforečnou**
- **pětiuhlíkatý monosacharid**
- **dusíkatou heterocyklickou bázi:**
 1. *pyrimidinové* jsou odvozené od šestičlenného pyrimidinu – cytosin (2-hydroxy-6-amino-pyrimidin), uracil (2,6-dihydroxy-pyrimidin), thymin (2,6-dihydroxy-5-methyl-pyrimidin),
 2. *purinové* jsou odvozené od pětičlenného purinu – adenin (6-aminopurin) a guanin (2-amino-6-hydroxy-purin).

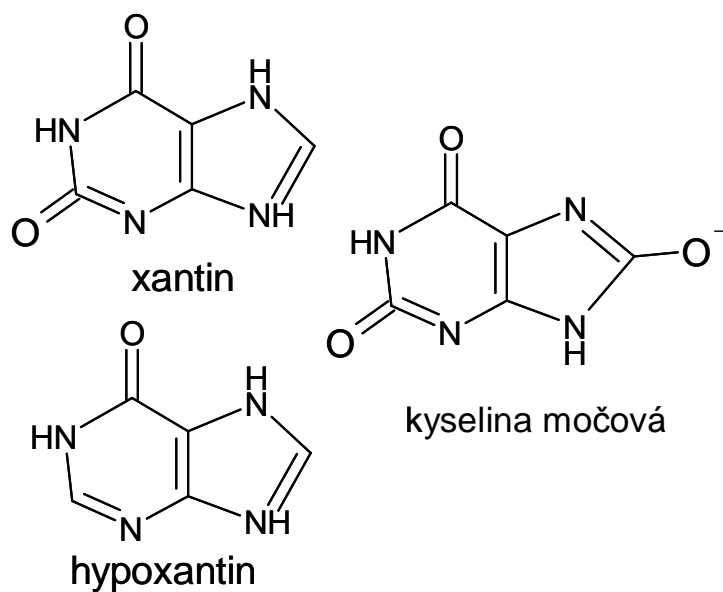
Nahodilou kombinací mononukleotidů v průběhu polymerního řetězce může vznikat obrovský počet různých nukleových kyselin. Primární struktura je určena právě touto sekvencí nukleotidů v polymerním řetězci. Sekundární struktura nukleových kyselin byla bezpečně zjištěna u DNA hlavně díky studiu rentgenové difrakce. Je známo, že vždy dvě dusíkaté báze se mohou navzájem vázat slabými vazbami pomocí vodíkových můstků. Takové dvojice může vytvořit adenin (A) s thyminem (T) a guanin (G) s cytozinem (C) (Obr. 9).



Obr. 9. Schématické znázornění Watson-Crickova párování bází v nukleových kyselinách s vyznačenými redoxními místy

2.2.2 Studované deriváty purinu

Volně v buňkách se nacházejí puriny, které jsou produkty metabolismu purinových bazí. Je to xantin, hypoxantin a kyselina močová, konečný produkt katabolismu purinů.



Obr. 10. Deriváty purinu

2.2.2.1 Kyselina močová

Kyselina močová (chemicky 2,6,8-trihydroxypurin) – $C_5H_4N_4O_3$ s molekulovou hmotností $M_r=168,11$ g/mol je běžnou součástí močových konkrementů a její soli (uráty, močany) jsou konečným produktem odbourávání purinových nukleotidů u většiny primátů (včetně člověka), ptáků, suchozemských plazů a hmyzu. Přítomna je v moči všech masožravců. Vzniká působením enzymu xantinoxidázy na deriváty jak endogenních, tak exogenních purinových bází (adeninu a guaninu). Kyselina močová je konečným produktem metabolismu purinů u primátů a člověka. U nižších živočichů je kyselina močová dále metabolizována urikázou na allantoin, který je podstatně lépe rozpustný než kyselina močová. Ztráta aktivity urikázy vedla u lidí a primátů ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v krvi.

Většina syntetizované kyseliny močové (90 %) se v ledvinách zpětně vstřebává do krve a podílí se na antioxidační ochraně organismu. Kyselina močová je málo rozpustná ve vodě a v přesycených roztocích tvoří bílé jehlicovité krystaly, teplem se rozkládá bez tavení za uvolnění HCN. Kyselina močová patří mezi heterocyklické sloučeniny, její struktura je odvozena od purinu. Je to slabá dvojsytná kyselina ($pK_{a1} = 5,4$; $pK_{a2} = 11,3$), ve vodě téměř nerozpustná: 1 g se rozpouští v 15 000 dílech studené vody (tj. 0,007 g/100 g vody) nebo 2 000 dílech vařící vody; rozpustná je v glycerolu, roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů, octanu sodném a fosforečnanu sodném, nerozpustná v alkoholu a éteru. Většina jejích kyselých solí se také špatně rozpouští ve vodě, lithná sůl je ze všech solí kyseliny močové nejvíce rozpustná. Při fyziologickém pH krve (kolem 7,4) se v plazmě vyskytuje převážně ionizovaná forma kyseliny močové: přítomny jsou uráty (močany) monosodné a monodraselné. Nedisociovaná kyselina močová je přítomna pouze v malém množství. Rozpustnost volné kyseliny při 37 °C je 64 mg/l (381 μ mol/l), rozpustnost urátů 84 mg/l (500 μ mol/l).

Role v metabolismu

Jako její nejdůležitější antioxidační působení se uvádí inhibice tvorby hydroxylového radikálu. Souvisí se schopností kyseliny močové vázat železo a měď za tvorby stabilních koordinačních komplexů, které nepodporují radikálové reakce. Kyselina močová se při tvorbě koordinační vazby s kovovými ionty neoxiduje a nemění svoji strukturu, vazbou iontů přechodných kovů však dochází k inhibici Fentonovy reakce. Při této reakci vzniká z peroxidu vodíku v přítomnosti volných iontů Fe(II) nebo Cu(I) hydroxylový radikál ($HO\bullet$). Jde o velmi reaktivní částici, která v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními biomolekulami (nenasycenými mastnými kyselinami, aminokyselinami a bázemi nukleových kyselin).

Vazbou železa také dochází k výrazné inhibici oxidace askorbátu, probíhající za přítomnosti iontů železa a k potlačení peroxidace lipidů. Brání také tvorbě oxohemových oxidantů vznikajících reakcí hemoglobinu s peroxidy, zabraňuje lýze erytrocytů vlivem peroxidačního poškození a reaguje s mnoha reaktivními formami kyslíku, které se tvoří v organismu, vychytává např. alkoxylové radikály ($RO\bullet$) i $HClO$. Volné kyslíkové radikály mohou neenzymaticky měnit kyselinu močovou na allantoin. Jeho koncentrace v krevní plazmě nebo moči může sloužit jako ukazatel zátěže organismu volnými radikály. Po reakci s hydroxylovým radikálem a s perferoxylovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) se urát mění na radikál (urátový anionradikál, jehož nespárovaný elektron je lokalizován na

pětičlenném kruhu), který může biologicky škodit. Tento urátový radikál může být účinně vychytán kyselinou askorbovou.

Zdroj (syntéza, příjem)

Syntéza kyseliny močové probíhá pouze ve tkáních obsahujících enzym xantinoxidázu, tj. především v játrech, střevní sliznici a mléčné žláze, zatímco syntéza a další metabolismus purinů probíhá i ve všech ostatních tkáních. Syntéza kyseliny močové je vlastně katabolickou drahou metabolismu purinových nukleotidů: adeninové nukleotidy jsou metabolizovány přes nukleosidy adenosin a inosin až na hypoxantin; guaninové nukleotidy se odbourávají přes guanosin a guanin za vzniku xantinu. Enzym xantinoxidáza katalyzuje obě poslední reakce syntézy kyseliny močové: oxiduje hypoxantin na xantin a xantin pak na kyselinu močovou. Při této reakci vznikají i reaktivní superoxidové radikály a peroxid vodíku.

Endogenní syntéza činí přibližně 350 mg/den. Kromě endogenních purinů ovlivňují urátový pool v organismu také puriny přijaté potravou (kolem 300 mg/den). Potravou přijímané puriny (přítomny hlavně v buněčných jádrech, v potravě tedy nejvíce v mase) se lehce resorbují do buněk střevní sliznice. V enterocytech se prakticky kompletně oxidují na kyselinu močovou enzymem xantindehydrogenázou (xantinoxidáza a xantindehydrogenáza jsou dvě formy téhož enzymu; xantindehydrogenáza předává elektrony odebrané svému substrátu na NAD⁺, zatímco xantinoxidáza na O₂).

Zvýšené odbourávání purinových bází (např. při vrozeném defektu enzymu, který se podílí na resyntéze purinových nukleotidů z purinových nukleosidů nebo bází uvolněných z již degradovaných nukleotidů) a nadprodukce purinových nukleotidů de novo syntézou (z aminokyselin a ribóza-5-fosfátu) vede k nadprodukci kyseliny močové.

Distribuce v organismu, obsah ve tkáních

Množství kyseliny močové v organismu (přibližně 1 g, ale může být patologicky zvýšeno až na 30 g) je dáno rovnováhou mezi její syntézou a eliminací z organismu. Nachází se v plazmě (volná i vázaná na proteiny: albumin a specifický globulin), moči, a také sekretu dýchacích cest.

Díky špatné rozpustnosti ve vodě může docházet k tvorbě a ukládání krystalů kyseliny močové v okolí kloubů (dna) nebo k tvorbě konkrementů v močových cestách – hlavně jako volná kyselina, ale částečně i ve formě sodné nebo amonné soli, tvoří podstatnou část ledvinových a močových kamenů ve formě již zmíněných bílých jehlicovitých krystalů.

Způsob vylučování nebo metabolismus

V lidském organismu se nevyskytuje aktivní urikáza (její gen je zmutován), která u většiny ostatních savců přeměňuje kyselinu močovou na allantoin. Tato látka však může z kyseliny močové vznikat i neenzymaticky působením volných kyslíkových radikálů a můžeme ji tedy v krevní plazmě člověka prokázat (jednotky až desítky $\mu\text{mol/l}$).

Více než 80 % kyseliny močové je vylučováno z těla ledvinami, méně než 20 % trávicím traktem. V proximálním tubulu ledvin se téměř všechna profiltrovaná kyselina močová resorbuje, znovu se vrací do moče aktivní tubulární sekrecí v distálním tubulu a následně je část opět aktivně resorbována. Děje v distálním tubulu mohou být ovlivněny řadou aniontů

a léků. Průměrná hodnota u zdravých osob je 8-10 ml/min, ale pouze 6-12 % profiltrované kyseliny močové se nakonec definitivně vyloučí močí. Fyziologická denní exkrece ledvinami je až 800 mg (4,76 mmol), při nízko purinové dietě bývá exkrece nižší: do 600 mg (3,57 mmol/l). Kyselina močová ze slin, žaludeční sekrece, žluči a pankreatických šťáv je bakteriemi v tlustém střevě metabolizována na CO_2 a NH_3 .

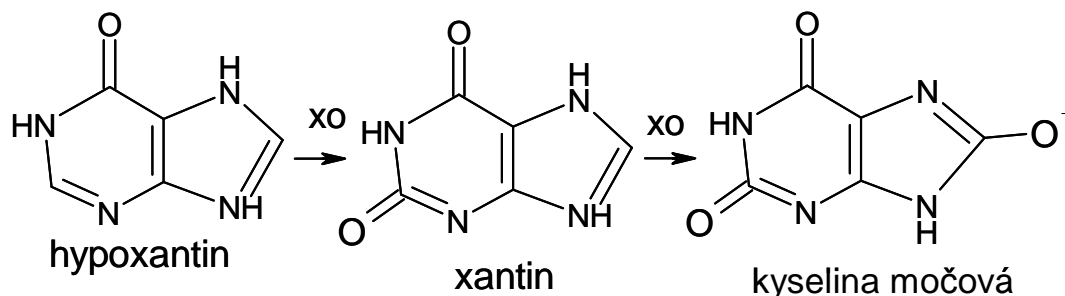
Kontrolní (řídící) mechanismy

Zdá se, že existuje souvislost mezi zvyšováním koncentrace kyseliny močové v organismu a snahou organismu o zachování dostatečné antioxidační kapacity: nedostatek jiných antioxidantů nebo nadprodukce reaktivních forem kyslíku vede ke zvyšování koncentrace kyseliny močové.

Vysoké koncentrace kyseliny močové (1 mmol/l) výrazně zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku produkovaných polymorfonukleárními leukocyty, zatímco nízké koncentrace kyseliny močové (100 $\mu\text{mol/l}$) intenzivně vychytávají produkty oxidačního vzplanutí těchto leukocytů [16].

2.2.2.2 Xantin a hypoxantin

Xantin (X) (2,6-dihydroxypurin) – $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ s molekulovou hmotností $M_r=152,11$ g/mol a hypoxantin (HX) (6-hydroxypurin) – $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$ s molekulovou hmotností $M_r=136,11$ g/mol jsou heterocyklické dusíkaté báze odvozené od struktury purinu a jsou prekurzory kyseliny močové (Obr. 11). Poměr xantinu a hypoxantinu v moči je obvykle 2:1. Hypoxantin je rozpustnější ve vodě než xantin a kyselina močová a mají přibližně stejně nízkou rozpustnost v moči. Teoreticky by mohlo docházet k tvorbě xantinových močových konkrementů, avšak jejich výskyt je v praxi velmi vzácný, protože celkové množství vylučovaného xantinu je pod saturační úrovní (asi 0,5 mg/ml). Dokonce i v případě vrozeného defektu xantinoxidázy (xanturie), kde je téměř jediným endoproductem v moči pouze xantin, je výskyt xantinových konkrementů velmi vzácný.



Obr. 11. Přeměna hypoxantinu na kyselinu močovou

2.2.2.3 Allantoin, allopurinol a oxypurinol

Allopurinol (Obr. 12) – $C_5H_4N_4O$ s molekulovou hmotností $M_r=136,11$ g/mol je strukturální izomer hypoxantinu. Je to inhibitor xantinoxidázy, která katalyzuje konverzi hypoxantinu a xantinu na kyselinu močovou, endoprodukt při biochemickém katabolismu purinů u člověka.

Allopurinol (Milurit) se v podobě tablet užívá ke snižování hladiny koncentrace kyseliny močové v krvi. Zvyšující se hladina koncentrace KM v krvi může způsobit poruchu ledvin a vznik ledvinových kamenů.

Allopurinol může být použit jako preventivní látka při vzniku těchto potíží a může zamezit onemocnění dnou. Dna je metabolická porucha charakterizovaná hyperurikémií a ukládáním urátu sodného do tkání. Příčinou je nadprodukce kyseliny močové. Tento proces je potlačen allopurinolem. Allopurinol a jeho metabolity jsou kompetitivními inhibitory xantinoxidázy. Allopurinol může zabránit oxidaci 6-merkaptopurinu na 6-thiomočovou kyselinu. Inhibicí katabolismu 6-merkaptopurinu u člověka může allopurinol podpořit protinádorový a imunosupresivní účinek 6-merkaptopurinu. Objevení tohoto mechanismu přineslo důkaz o inhibici xantinoxidázy allopurinolem.

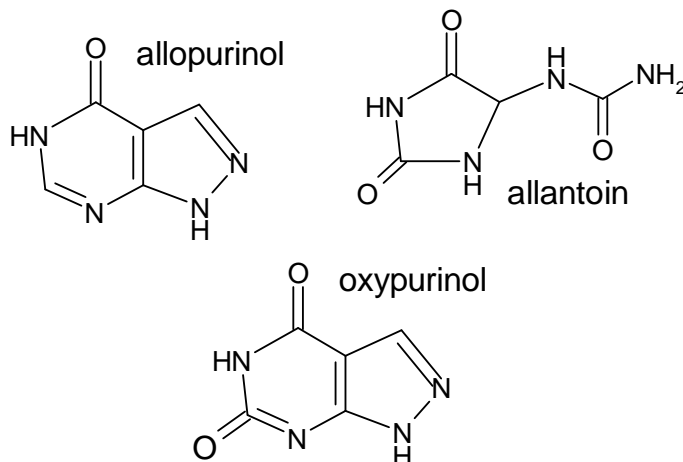
Allopurinol rovněž inhibuje oxidaci endogenních purinů a výsledkem tohoto procesu je snížení koncentrace kyseliny močové v krevním séru i moči a zvýšení renální exkrece xantinu a hypoxantinu. Tohoto účinku se využívá k léčbě primární i sekundární (spojené s malignitami) hyperurikémie. Snížení produkce kyseliny močové závisí na dávce allopurinolu. Rozpustnost allopurinolu ve vodě je při 25 °C 0,44 mg/ml a při 37 °C 0,75 mg/ml. Při léčbě dochází k poklesu hladin urátu v plasmě a zmenšení velikosti urátového fondu se současným vzestupem rozpustnějšího xantinu a hypoxantinu. Afinita allopurinolu ke xantinoxidáze je asi 10-40krát vyšší než afinita xantinu.

Allopurinol je vylučován hlavně glomerulární filtrací, pouze 20 % je vyloučeno stolicí. Po 5-7 dnech perorální léčby je možno nalést 60-70 % podaného allopurinolu ve formě oxypurinolu v moči, 6-12 % je vyloučeno močí v nezměněné formě. Pouze velmi malé množství (asi 3 % podané dávky) se vyloučí jako allopurinol-1-ribonukleosid nebo oxypurinol-7-ribonukleosid.

Oxypurinol (Obr. 12) – $C_5H_4N_4O_2$ s molekulovou hmotností $M_r=152,11$ g/mol vzniká enzymatickou oxidací allopurinolu. Afinita oxypurinolu ke xantinoxidáze je vysoká, ale jeho vazba není kovalentní. Komplex oxypurinol-xantinoxidáza může být reaktivován dialýzou za aerobních podmínek během 5 hodin. Oxypurinol je méně rozpustný ve vodě než allopurinol. Metabolická konverze allopurinolu na oxypurinol pomocí xantinoxidázy je rychlá, poměr allopurinolu k oxypurinolu v plazmě se rychle mění. Po vysokých dávkách allopurinolu může dojít k inhibici jeho oxidace. Allopurinol ani oxypurinol se nevážou významně na plasmatické proteiny. Oxypurinol je reabsorbován v tubulech podobně jako kyselina močová. Průměrná hodnota oxypurinolu při normálních renálních funkcích je přibližně 16 ml/min. (3krát vyšší než kyseliny močové).

Allantoin (Obr. 12) s molekulovou hmotností $M_r=168,11$ g/mol se snadno rozpouští ve vodě a je snadno vylučován močí. Jestliže je nefunkční v přeměně KM na allantoin, koncentrace kyseliny močové se zvýší. KM není rozpustná tak jako allantoin a vytváří ledvinové kameny,

zvláště u lidí, a krevní kameny speciálně u dalmatinů a psů s poškozenými játry, povrchy kloubů u ptáků a lidí s dnou nebo další nepříjemné zdravotní potíže.

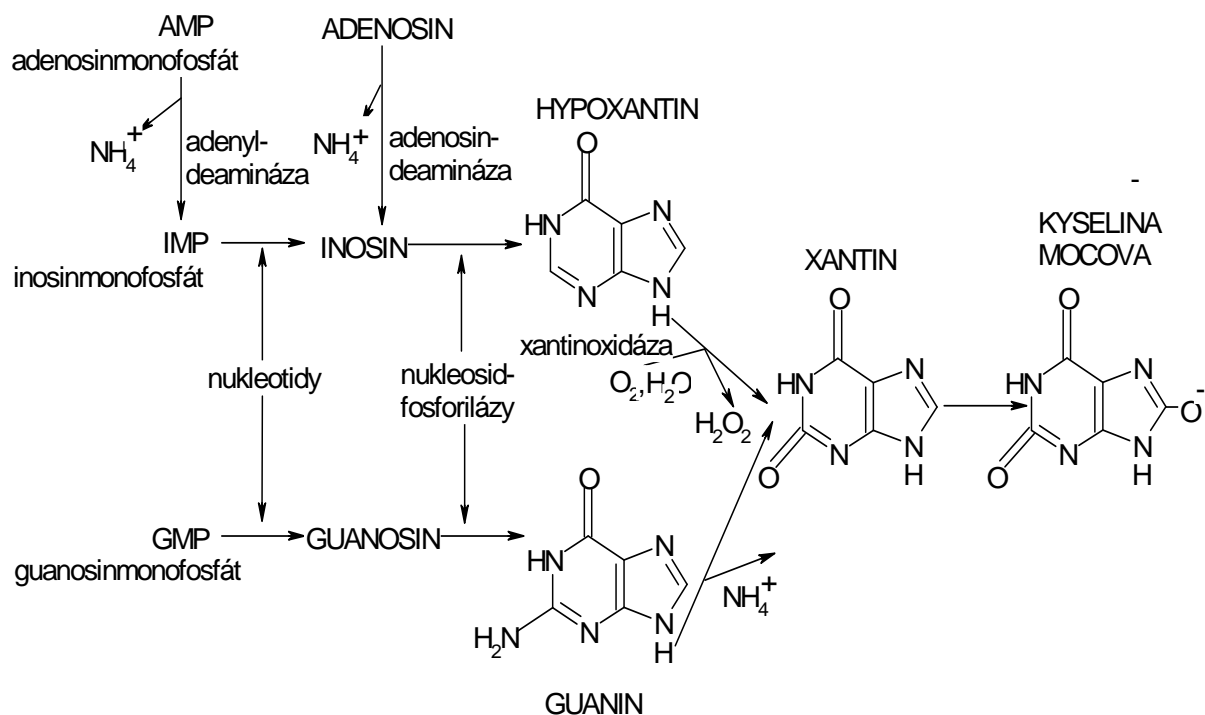


Obr. 12. Další studované látky

2.2.3 Syntéza a odbourávání purinů

Organismus je schopen využívat puriny, které přijímá v potravě, stejně tak si je dokáže syntetizovat sám de novo. Hlavním místem syntézy jsou játra.

Výchozí sloučeninou biosyntézy purinů je D-ribose-5-fosfát, který přijímá difosfát za tvorby 5-fosforibosyl-1-difosfátu (dříve fosforibosylpyrofosfát, PRPP). Postupně v této tzv. syntéze de novo je vybudován purinový cyklus. Nejdůležitějším regulačním místem je syntéza fosforibosylaminu. Enzym amidofosforibosyltransferáza je inhibován purinovými nukleotidy. Ve většině buněk probíhá aktivní obrat nukleových kyselin, při kterém se uvolňuje guanin, adenin a hypoxantin. Tyto volné purinové báze jsou jen zčásti dále katabolizovány na kyselinu močovou (Obr. 11 a 13). Zbývající část je přeměňována zpětně na příslušné nukleotidy recyklační dráhou (tzv. "salvage pathway"). Toto zpětné využití bazí zajišťují enzymy hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferáza (HPRT) a adeninfosforibosyltransferáza (APRT). Klinický význam jejich deficitů je uveden v dalším textu. Odbourávání purinů končí u člověka u kyseliny močové, která se vylučuje ledvinami. Savci nenáležící mezi primáty oxidují kyselinu močovou na vylučovaný produkt allantoin. Důležitým enzymem odbourávání je xantinoxidáza, která oxiduje hypoxantin a dále xantin na kyselinu močovou. Kyselina močová vzniká kromě uvedené syntézy de novo ještě ze dvou zdrojů: z nukleotidů v potravě a z rozpadu tkáňových nukleoproteinů. Zhruba 1/3 kyseliny močové je vylučována zažívacím traktem a 2/3 jsou vyloučeny ledvinami. V ledvinách dochází k téměř 100% glomerulární filtraci.



Obr. 13. Část katabolického řetězce purin

2.2.4 Onemocnění v důsledku dědičných defektů purinového a pyrimidinového metabolismu

Puriny a pyrimidiny jsou základem struktury nukleových kyselin a hrají významnou roli při kontrole mnoha různých buněčných funkcí, z nichž nejdůležitějšími jsou transport a uskladnění energie (adenosin resp. guanosintrifosfát), regulace buněčného metabolismu a funkce (např. cyklický adenosinmonofosfát, 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid) a tvorba koenzymů (nikotinamidadenindinukleotid resp. nikotinamidadenindinukleotidfosfát) aktivních meziproduktů metabolismu fosfolipidů a cukrů. Z tohoto důvodu je klinická prezentace onemocnění v důsledku dědičných defektů jejich metabolismu velmi široká a může postihovat jakýkoliv systém.

V současné době jsou známy téměř tři desítky poruch purinového a pyrimidinového metabolismu, přičemž jejich počet stále roste.

První defekt byl objeven v roce 1954. Většina chorob byla objevena v posledních dvaceti letech. Stimulací výzkumu regulace a vzájemných vztahů purinového a pyrimidinového metabolismu se staly především objevy enzymových defektů sdružené s poškozenou funkcí imunitního systému u dětí. Společným jmenovatelem těchto onemocnění jsou geneticky podmíněné změny v aktivitách enzymů (Tab. 3). Snížená nebo až nulová aktivita příslušného enzymu vede k metabolickému bloku, což má za následek abnormální hromadění fyziologických či atypických metabolitů v tkáních nebo tělesných tekutinách a dochází tak k poškození organismu. Genetické postižení může také vyvolat zvýšenou aktivitu příslušného enzymu, která vede též k nahromadění určitých metabolitů. Způsob, jakým akumulující se metabolit poškozuje cílový orgán není však ještě v současné době znám. Vzhledem k této

nejasné patogenезi nelze též u řady onemocnění efektivně terapeuticky zasáhnout. Kausální léčba není známa zejména u těch defektů, kde se jedná o postižení centrální nervové soustavy. U většiny deficitů byl prokázán autozomálně recesivní způsob dědičnosti. Gonozomálně recesivní typ dědičnosti vykazují jen dvě onemocnění: deficit hypoxanthinfosforibosyltransferázy (HPRT) a zvýšená aktivita fosforibosyldisfátsyntetázy (PRPPs). K této skupině chorob se též řadí poruchy ve vylučování kyseliny močové, které způsobují poškození ledvin a přispívají k rozvoji dnavého syndromu [22].

Tab. 3. Přehled dědičných metabolických poruch purinů a pyrimidinů

Deficit hypoxanthin-fosforibosyltransferázy (HPRT), částečný = Kelley-Seegmillerův syndrom, kompletní= Lesch-Nyhanův syndrom
Deficit adeninfosforibosyltransferázy (APRT), 2,8 - dihydroxyadeninová litiáza
Deficit xanthinoxidázy (XOD), dědičná xanthinurie
Deficit adenosindeaminázy (ADA)
Zvýšená aktivita adenosindeaminázy (ADA)
Deficit purinnukleosidfosforylázy (PNP)
Deficit myoadenyládeaminázy (M-AMPDA)
Deficit adenylosukcinátlyázy (ASase)
Deficit molybdenového kofaktoru – deficit sulfitoxidázy SO, xanthinoxidázy XOD
Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN)
Zvýšená aktivita fosforibosyldifosfátsyntetázy (PRPPs)
Primární dna
Dědičná renální hypourikémie
Deficit inosintrifosfát pyrofosfohydrolázy (ITP)

Převzato z: <http://1.lf1.cuni.cz/kocna/biochem/text8.htm>

Diagnostika poruch purinového a pyrimidinového metabolismu je stejně jako v případě ostatních metabolických poruch prováděna na úrovni detekce metabolitů, funkce enzymu a mutace genu. Nejvhodnějším materiálem pro metabolitovou diagnostiku největší části defektů purinového a pyrimidinového metabolismu je moč, neboť nežádoucí metabolity jsou do ní efektivně akumulovány. Konečným produktem purinového metabolismu je kyselina močová a proto její monitorování v tělních tekutinách může vést k odhalení části těchto defektů.

Diagnostické metody pro detekci enzymových defektů purinového a pyrimidinového metabolismu jsou například: vysokotlaká kapalinová chromatografie s detekcí v ultrafialové oblasti, nukleární magnetická rezonance, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, kapilární elektroforéza.

Konečným produktem purinového metabolismu je kyselina močová a proto její monitorování v tělních tekutinách může vést k odhalení části těchto defektů. Aby bylo možno provádět analýzy purinů a pyrimidinů v biologických vzorcích, bylo třeba vypracovat postupy, při kterých budou eliminovány nebo minimalizovány a verifikovány vlivy komplexní biologické matrice.

2.3 Analytická stanovení pomocí elektrochemických metod

Bylo ukázáno, že purinové báze nukleových kyselin a některé jejich deriváty mohou být vyloučeny na rtuťové elektrodě při dostatečně pozitivních potenciálech a vytvořený špatně rozpustný komplex rtuti a purinového derivátu může být následně rozpuštěn posunem potenciálu k negativním potenciálům [13, 17-20]. Metoda dostala název katodická rozpouštěcí voltametrie a byla používána v kombinaci s cyklickou voltametrií nebo diferenční pulzní voltametrií. Citlivost stanovení závisela na několika parametrech, např. vylučovací potenciál, doba vylučování, velikost elektrody nebo rychlost polarizace. Purinové báze mohly být stanoveny v koncentracích 1 – 10 nM (limit detekce adeninu byl 2 nM při době vylučování 6 min) [19].

Ukázalo se, že komplex mezi purinovými deriváty a rtuťí elektrody je pevný a stabilní po promytí, takže bylo možno při měření využít přenosové techniky [21]. Měření adeninu a cytosinu pomocí katodické přenosové rozpouštěcí voltametrie naznačila, že by bylo možné stanovit tyto látky ve směsi, protože byly nalezeny rozdíly v chování obou látek (na rozdíl od nepřenosové techniky).

2.3.1 Kyselina močová

Stanovení KM v moči má velký význam v lékařské diagnóze. Abnormální hladiny KM v moči nebo v krevním séru jsou symptomem různých onemocnění, např. těžké hepatitidy, dny, pneumonie nebo Lesh-Nyhamova syndromu [22]. Stanovení KM je proto důležité a v minulosti se objevila řada metod stanovení založených i na její elektroaktivitě [23-28]. Stanovení v tělních tekutinách je zpravidla komplikováno dvěma problémy. Za prvé, při stanovení interferuje kyselina askorbová (KA), která je oxidována při podobném potenciálu jako KM. Za druhé, citlivost stanovení je nízká, přičemž výběrem vhodné měřicí techniky a pracovní elektrody je možno tento problém z části eliminovat. Tak např. u modifikované grafitové uhlíkové elektrody (GCE) v kombinaci s DPV byl detekční limit pro KM 10 nM a pro KA 15 nM. Potenciálový posun mezi KM a KA byl 200-250 mV. V průběhu asi tří desetiletí se objevila řada prací, které vylepšují detekční limit a potenciálový posun mezi KM a KA. Vylepšení se týká např. použití adsorptivního nahromadění na uhlíkové elektrodě [29], použití modifikovaných elektrod [23], použití modifikovaných elektrod pokrytých polymerními filmy [30, 31], použití různých druhů tištěných (screen-printed) elektrod [32], atd.

Rovněž GCE modifikovaná mikrokristaly fullerenu C₆₀ byla využita pro stanovení KM v přítomnosti KA. I když detekční limit KM byl stanoven na hodnotu 120 nM, v tomto případě oba signály mohly být odděleny díky silnému katalytickému uhlíkovému filmu v kombinaci se square-wave voltametrií [33].

Zcela nedávno se objevila práce, ve které se používá pro průběžné stanovení KM v nadbytku KA elektrod z pyrolytického uhlíku. Detekční limit byl stanoven na 52 nM KM v přítomnosti 200 μM KA [34].

2.3.2 Xantin a hypoxantin

Pro průběžné stanovení hypoxantinu a xantinu byl navržen multianalytický senzor založený na modifikovaných tištěných uhlíkových elektrodách s využitím cyklické voltametrie.

Kalibrační křivky byly lineární v oblasti koncentrace 4-30 mM pro hypoxantin a 2-40 mM pro xantin s limitem detekce 0,04 mM a 0,07 mM [32]. Elektrochemická oxidace xantinu a některých jeho přirozeně se vyskytujících derivátů (teofylin, teobromin, kafein) byla studována na borem dopovaných diamantových elektrodách. Voltametrická analýza potvrdila, že reakční mechanismus je podobný oxidačnímu mechanismu purinových derivátů na pyrolytické uhlíkové elektrodě. V tomto případě byla koncentrační oblast využitelná pro analytické účely v rozmezí koncentrací xantinu 1-100 μ M [35]. Byl studován i oxidační mechanismus a adsorpce hypoxantinu pomocí voltametrických a impedančních metod na skleněné uhlíkové elektrodě [36].

2.3.3 Allantoin, allopurinol a oxypurinol

Allopurinol je inhibitorem xantinoxidázy a jeho hlavním metabolitem je oxypurinol. Obě látky byly oxidovány na skleněné uhlíkové elektrodě stejně jako na elektrodě rtuťové, kde tvořily nerozpustné sloučeniny [37]. Anodické chování na uhlíkových elektrodách bylo použito pro navržení reakčního mechanismu [38, 39]. Na základě získaných výsledků byl sestaven elektrochemický detektor pro HPLC pro stanovení allopurinolu a oxypurinolu v lidském krevním séru a moči [37, 40].

2.4 Purinové deriváty v přítomnosti Cu(II)

V přítomnosti adeninu Cu(II)/Cu(Hg) pár přechází na Cu(II)/Cu(I) a Cu(I)/ Cu(Hg) páry (redukce Cu(II) na rtuťové elektrodě) [41, 42]. Špatně rozpustné sloučeniny Cu(I) a purinů byly akumulovány na rtuťové elektrodě [41, 42] nebo na GCE [43] a následně byl tento depozit rozpuštěn anodicky – oxidace na Cu(II) nebo katodicky – redukce na Cu(0) změnou polarizačního potenciálu za vzniku voltametrického signálu.

Nedávno Farias a spol. publikovali řadu prací, kde popisují ultra stanovení některých purinových bazí nukleových kyselin v přítomnosti Cu(II) [44-46]. Stanovení pro adenin a guanin bylo provedeno v 1 mM NaOH pomocí adsorptivní rozpouštěcí voltametrie a lineární závislost v koncentračním intervalu 0,75 až 7,5 nM s limitem detekce 0,03 nM [44].

2.4.1 Kyselina močová

KM byla oxidována na měděné elektrodě v 0,05 M NaOH a boraxu (pH 9,18) a na základě voltametrických výsledků bylo navrženo reakční schéma její oxidace. Bylo zjištěno, že KM poskytuje dvě anodické vlny, první vzniká při potenciálu 0,27 V a KM se oxiduje na allantoin, druhá při potenciálu 0,48 V odráží následnou oxidaci allantoinu na karbonyl-di-močovinu [47]. Byl zkonstruován voltametrický senzor pro průběžné stanovení KM v přítomnosti KA. Lineární kalibrační křivka byla získána pro koncentrační interval 20-50 μ M KM ve fyziologickém pH s detekčním limitem 10 nM v přítomnosti desetinásobného nadbytku KA. Pro praktické využití byl navržen protokol pro stanovení KM v lidské moči a krevním séru v přítomnosti KA (bylo použito tablety s vitamínem C) [48].

2.4.2 Xantin

Stanovení xantinu v přítomnosti Cu(II) bylo popsáno jak na visící kapkové rtuťové, tak na uhlíkové pastové elektrodě [49-53]. Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie na HMDE umožnila stanovení xantinu v koncentrační oblasti 2-20 nM, s limitem detekce 0,5 nM (pro dobu akumulace 4 min) [51]. Na skleněné uhlíkové elektrodě bylo navrženo ultrasenzitivní stanovení xantinu pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie v roztocích obsahujících Cu(II). Metoda je deklarovaná jako jednoduchá, přesná a rychlá, a umožňuje stanovit xantin v koncentracích od 20-166 nM [50]. Byly rovněž navrženy rovnovážné rovnice pro oxidaci Cu(0) v přítomnosti xantinu [52].

2.4.3 Hypoxantin

Efektivní adsorpce hypoxantinu na HMDE v přítomnosti Cu(II) bylo studováno pomocí cyklické voltametrie. Z adsorpčního chování se předpokládá, že komplex Cu-hypoxantin je na elektrodě uspořádán ve vrstvách kolmo k povrchu elektrody. Získané výsledky byly využity pro analytické účely a podmínky měření optimalizovány. Byl zjištěn detekční limit 10 nM v nepřítomnosti mědi a 0,4 nM v přítomnosti mědi.

2.4.4 Allantoin, allopurinol a oxypurinol

Pro tyto sloučeniny se mi nepodařilo najít žádné odkazy na práce týkající se jejich elektroanalytického stanovení v přítomnosti mědi.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

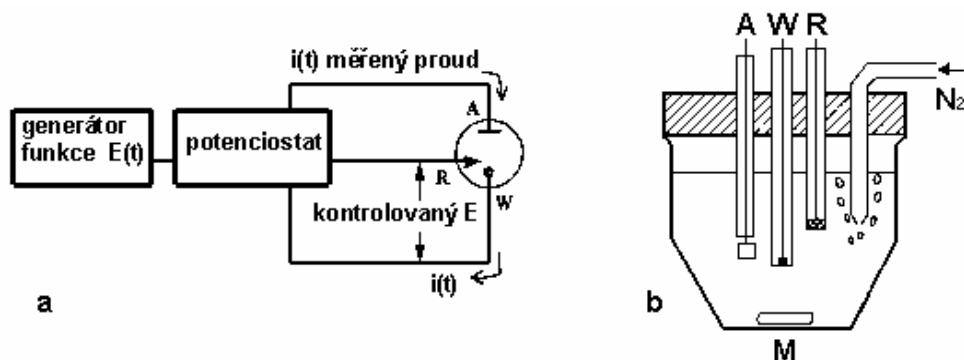
Sledované chemické látky – kyselina močová, xantin, hypoxantin, allopurinol, allantoin, oxypurinol a ostatní chemikálie pro přípravu elektrolytu byly zakoupeny u firmy Sigma a použity bez další úpravy. Vodné zásobní roztoky byly připraveny s tridestilovanou vodou.

3.2 Přístroje

Všechna voltametrická měření byla provedena na přístroji AUTOLAB (EcoChemie, Holandsko) s elektrodovým stojanem VA-Stand 663 Metrohm (Zurich, Švýcarsko). pH bylo měřeno na pH-metru Radelkis OP-208/1.

Měření byla provedena v roztoku elektrolytu MF ($0,3 \text{ M HCOONH}_4 + 0,05 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 + 0,05 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$), pH 6,48 o objemu 2 ml. Před každým měřením byl roztok v měřicí nádobce vybublán 5 minut argonem a po celou dobu měření byl argon vháněn nad zkoumaný roztok.

Zkoumaný roztok byl umístěn v elektricky nevodivé nádobce. Pro přísun materiálu k elektrodě bylo v nádobce umístěno míchadlo. V roztoku byly ponořeny 3 elektrody: pracovní W (working), pomocná A (auxiliary) a referentní R (reference). Elektrody byly zapojeny do elektrického obvodu se zdrojem napětí a elektronickými obvody. Měřil se proud procházející obvodem. Schéma elektrolytické nádobky a náhradní elektronický obvod zapojení se třemi elektrodami je na Obr. 14.



Obr. 14. a) Schéma tříelektrodového zapojení používaného pro elektrochemické měření; b) Schéma elektrolytické nádobky: W – pracovní elektroda, R – referentní elektroda, A – pomocná elektroda, M – míchadlo, N_2 – přívod inertního plynu [54].

Na pracovní elektrodě probíhá elektrodový proces, který sledujeme. Potenciál pracovní elektrody je vztahován vůči referentní elektrodě s konstantním potenciálem. Referentní elektroda je od měřeného roztoku obvykle oddělena solným můstkem se zatavenou hustou skleněnou fritou nebo jiným pórovitým materiálem (Vycor), aby potenciál referenční elektrody byl co nejméně ovlivněn složením měřeného roztoku [55].

Při voltametrické analýze se používají rozličné pracovní elektrody z různých materiálů (obvykle se jedná o elektrody platinové, zlaté, uhlíkové i rtuťové). Potenciálové rozsahy jednotlivých elektrod jsou následující:

Rtuťová elektroda – obor potenciálů se pohybuje podle složení roztoku od +0,4 V do – 2,6 V, nad +0,4 V nastává anodické rozpouštění rtuti, pod -2,6 V nastává rozklad vody.

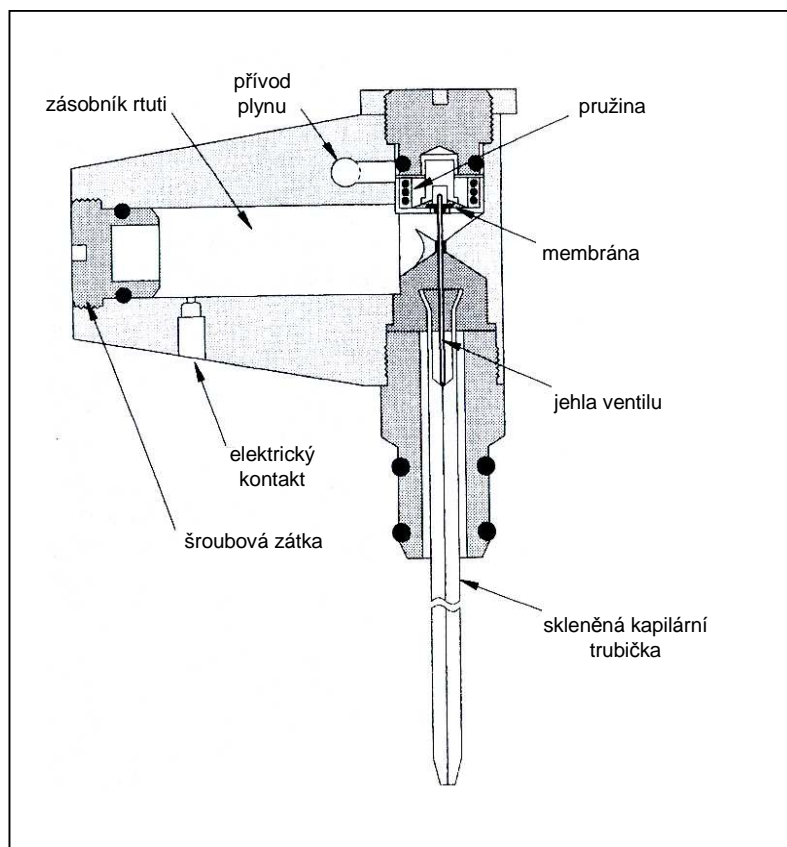
Platinová elektroda – elektrody z platiny mohou být v kyselém prostředí polarizovány až k +1,5 V, katodické vylučování vodíku nastává při velmi malém negativním potenciálu, s rostoucím pH se oblast použitelnosti posunuje k negativnějším potenciálům, v roztoku hydroxidu činí tento posun 0,5 až 0,7 V. Zlaté elektrody mají obdobné použití jako elektrody platinové

Uhlíková elektroda – potenciálový rozsah uhlíkových elektrod překrývá oblast použitelnosti rtuťové a platinové elektrody. Potenciálový rozsah zde nedosahuje příliš negativních ani příliš pozitivních hodnot. Největší potenciálový rozsah je pozorován u skelného uhlíku. V neutrálním roztoku lze skelný uhlík polarizovat od -0,75 V do +1,0 V [56].

Pro měření jsem použila jako pomocnou elektrodu platinový drát. Referentní elektrodou byla ve všech experimentech nasycená argentchloridová ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$) elektroda a pracovní elektrodou byla buď visící rtuťová kapková elektroda nebo uhlíková pastová elektroda.

3.2.1 Visící rtuťová kapková elektroda

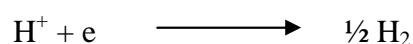
Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE – z angl. Hanging Mercury Drop Electrode) se skládá z kapiláry spojené se zásobníkem rtuti, rtuťová kapka se vytlačí z kapiláry a stabilizuje se u jejího ústí. V nejobvyklejším uspořádání je kapilára vertikální a kapka „visí“ na rtuťovém sloupci (Obr. 15).



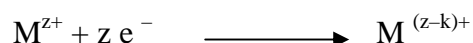
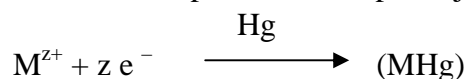
Obr. 15. Schéma HMDE od firmy Metrohm

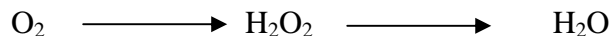
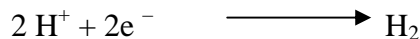
Je však také možno ohnout kapiláru vzhůru („ležící“ kapka), což má určité výhody, např. lepší stabilitu kapky a možnost použití kapilár s menším vnitřním průměrem, čímž se poněkud potlačí zpětná difúze kovu do kapiláry. Kromě nestability kapky a zpětné difúze je další důležitou nevýhodou HMDE pronikání roztoku dovnitř kapiláry. Často se stacionární rtuťové kapkové elektrody připravují mechanickým zavěšením nebo elektrolytickým vyloučením rtuťové kapky na malém kontaktu z inertního kovu (stříbra, platiny nebo zlata). Celý povrch kontaktu musí být pokryt rtutí a materiál kontaktu musí být co nejméně rozpustný ve rtuti. V každém případě je však nutno počítat s možností vzniku intermetalických sloučenin stanovené látky s materiálem kontaktu, zejména při použití zlatého kontaktu [4].

Potenciálové rozpětí limituje přepětí vodíku na rtuti a je ukončeno vlnou odpovídající nekatalyzované redukci vodíkových iontů:

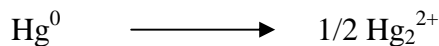


Při katodické polarizaci se uplatňují např. tyto redukční děje:





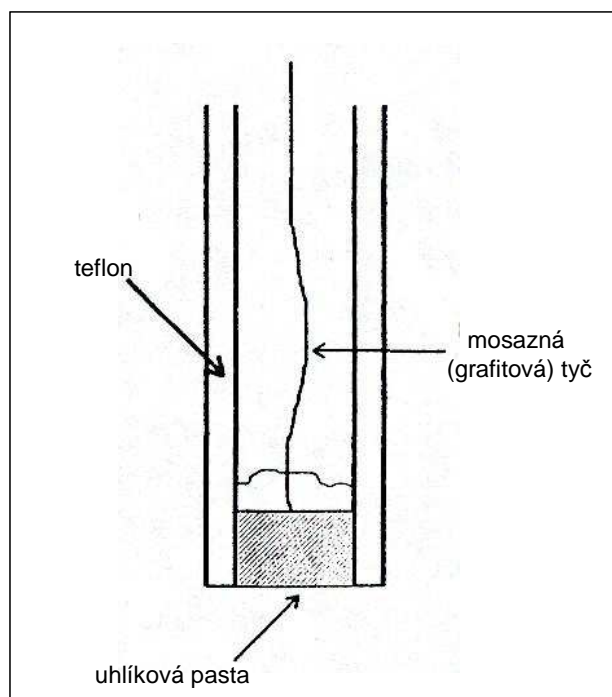
Při anodické polarizaci probíhají tyto děje a také oxidace Hg:



Při kontinuálně odvětvovaném napětí z potenciometru se potenciál vložený na rtuťovou kapkovou elektrodu plynule mění a jsou-li v roztoku aktivní depolarizátory, registruje se polarografická křivka s charakteristickými vlnami a typickým proudovým platem limitovaným převážně difuzí depolarizátoru k elektrodě [57].

3.2.2 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda (CPE – z angl. Carbon Paste Electrode) je speciálním typem tuhé elektrody (Obr. 16).



Obr. 16. Schéma uhlíkové pastové elektrody

Při vhodné konstrukci elektrody lze vytlačovat uhlíkovou pastu z elektrody podobně, jako se vytlačuje rtuťová kapka u rtuťových elektrod. Tímto způsobem je možno zajistit poměrně snadno obnovování aktivního povrchu elektrody, a to při dodržení dostatečné reprodukovatelnosti. Pro přípravu uhlíkové pasty se používá vhodné organické rozpouštědlo nebo silikonový olej.

Pevné nebo pastové elektrody z grafitu se používají při práci při pozitivních potenciálech, při nichž by již docházelo k rozpouštění rtuti. Běžné porézní grafitové materiály musí být

vhodným způsobem impregnovány (aby se zabránilo pronikání roztoku do pórů) nebo použity ve formě grafitové pastové elektrody, kdežto tzv. pyrolytický grafit a skelný uhlík nevyžadují impregnaci.

Při elektrolýze s tuhými elektrodami se tvoří film na povrchu elektrody a situace je složitější než u amalgamů. Tvorba a rozpouštění povrchových filmů se řídí složitějšími závislostmi, na něž mají vliv např. struktura a povrchová energie elektrody, povrchové katalytické jevy, struktura vyloučené látky atd. Při analýzách směsí dochází k četným interferencím a citlivost dosažitelná v praxi bývá často poněkud menší než u rtuťových elektrod. K dosažení reprodukovatelných výsledků je nutno zajistit stejnou velikost aktivního povrchu elektrody a jeho reprodukovatelné obnovování – tento problém se musí řešit specificky pro každý případ [4].

3.2.2.1 Příprava uhlíkové pasty a modifikované uhlíkové pastové elektrody

Uhlíková pasta obsahovala 70% grafitového prášku (Aldrich) a 30% minerálního oleje. Z této směsi byla pečlivým mísením připravena koexistenční hmota, která byla vytlačena do teflonové kruhové trubičky o průměru $r=2,5$ mm. Takto připravenou pastou bylo naplněno tělo používané elektrody. Před každým měřením byl povrch uhlíkové pastové elektrody obnoven otřením tenké vrstvy pasty o vlhký filtrační papír.

Po této úpravě byl povrch připraven pro měření vzorku. Pro měření jsem použila jako pomocnou elektrodu platinový drát. Referentní elektrodou byla ve všech experimentech nasycená Ag/AgCl/3M KCl elektroda a pracovní elektrodou byla buď visící rtuťová kapková elektroda nebo uhlíková pastová elektroda. Tříelektrodové uspořádání bylo použito pro eliminaci parazitních jevů v elektrickém obvodu, které eliminuje vliv odporu měřicího roztoku tím, že pomocí potenciostatu udržuje konstantní potenciál pracovní elektrody vůči referentní elektrodě nezávisle na velikosti proudu.

3.2.3 Měření koncentrace

Spektrofotometr 8452A – diode array spektrofotometr (Hewlett Packard) byl použit pro měření koncentrace některých vzorků. Koncentrace byla vypočtena podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = - \log(I_p / I_0) = \epsilon_{\max} \cdot c \cdot l$$

kde A.....absorbance

I_pintenzita prošlého světla

I_0intenzita dopadajícího světla

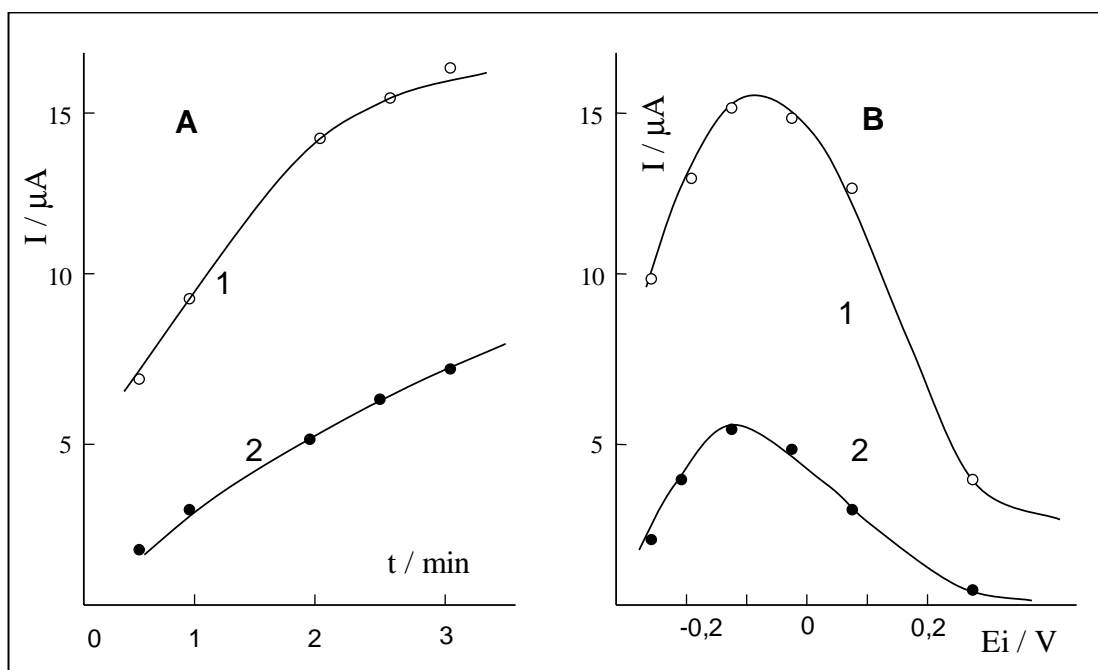
ϵ_{\max} absorbanční koeficient

c.....koncentrace dané látky

l.....délka kyvety v cm

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Moje experimentální činnost byla zaměřena na elektrochemickém stanovení komplexu purinových derivátů s Cu(I). Měření byla provedena na rtuťové kapkové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě v neutrálním prostředí fosfátového elektrolytu. Stanovení je založeno na tvorbě komplexu purin-Cu(I) na pracovní elektrodě. Jak bylo uvedeno výše, rozpuštění komplexu vhodnou změnou potenciálu má za následek vznik voltametrického signálu, který je mírou obsahu purinu ve vzorku. Srovnání výsledků získaných pomocí tří různých metod (cyklická voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a square-wave voltametrie) ukázalo, že nejvhodnější technikou u rtuťové kapkové elektrody je cyklická voltametrie a u uhlíkové pastové elektrody diferenční pulzní voltametrie. Důležitými optimalizačními parametry pro vznik komplexu jsou doba a potenciál depozice, při kterých je elektrogenována Cu(I) na elektrodě. Výsledek měření pro uhlíkovou pastovou elektrodu a xantin je ukázán na Obr. 17.



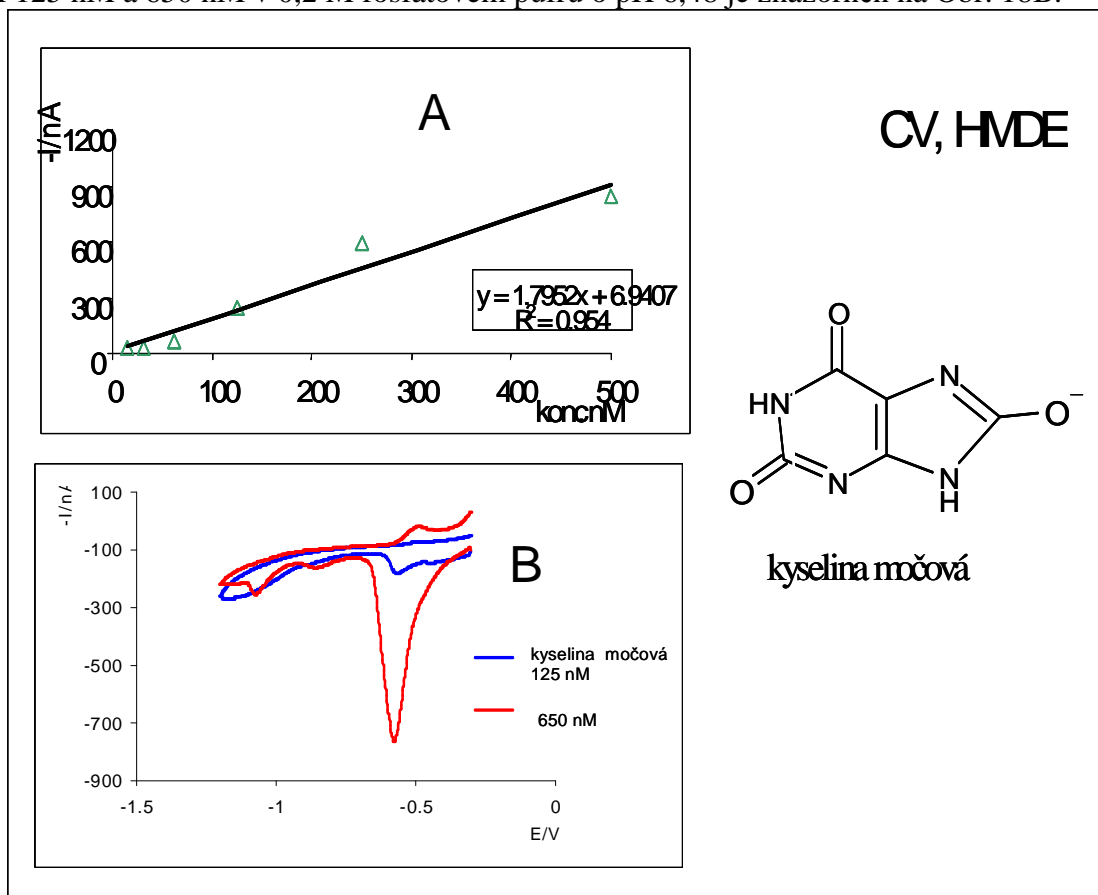
Obr. 17. Graf závislosti rozpouštěcích voltametrických pík xantinu na době (A) a potenciálu depozice (B). 1 – pík při 0,3 V, 2 – pík při 0,7 V. DPV měření byla provedena na CPE v 0,2 M fosfátovém pufru, pH 6,48. Koncentrace xantinu 10 μM , koncentrace Cu(II) 20 μM .

Pro voltametrická měření na rtuťové elektrodě bylo zjištěno, že nejvhodnější depoziční potenciál je -0,3 V a doba depozice byla zvolena rovněž 120 s. U cyklické voltametrie je ještě dalším parametrem rychlost polarizace elektrody, která je ale limitovaná použitým přístrojem. Po zjištění optimálních podmínek jsem u sledovaných látek naměřila koncentrační závislosti, což jsou závislosti výšky voltametrického proudu na koncentraci purinových derivátů. Tato měření se prováděla jak v přítomnosti Cu(II), tak ve vzorku, který měď neobsahoval. Na závěr jsem se pokusila stanovit několik látek ve směsi.

4.1 Stanovení kyseliny močové

Stanovení KM se klinicky provádí enzymaticky, a to tak, že KM je oxidována enzymem urikázou na peroxid vodíku a allantoin. Vzniklý peroxid vodíku reaguje s chlor-derivátem metyl-fenolu a aminoantipyrinem za katalýzy peroxidázy. Vzniká barevná sloučenina, kterou stanovujeme fotometricky při 500-530 nm. Při tomto stanovení interferuje bilirubin a kyselina askorbová. Referenční hodnoty v krevním séru u lidí se pohybují u lidí v rozmezí 240-520 μM [34].

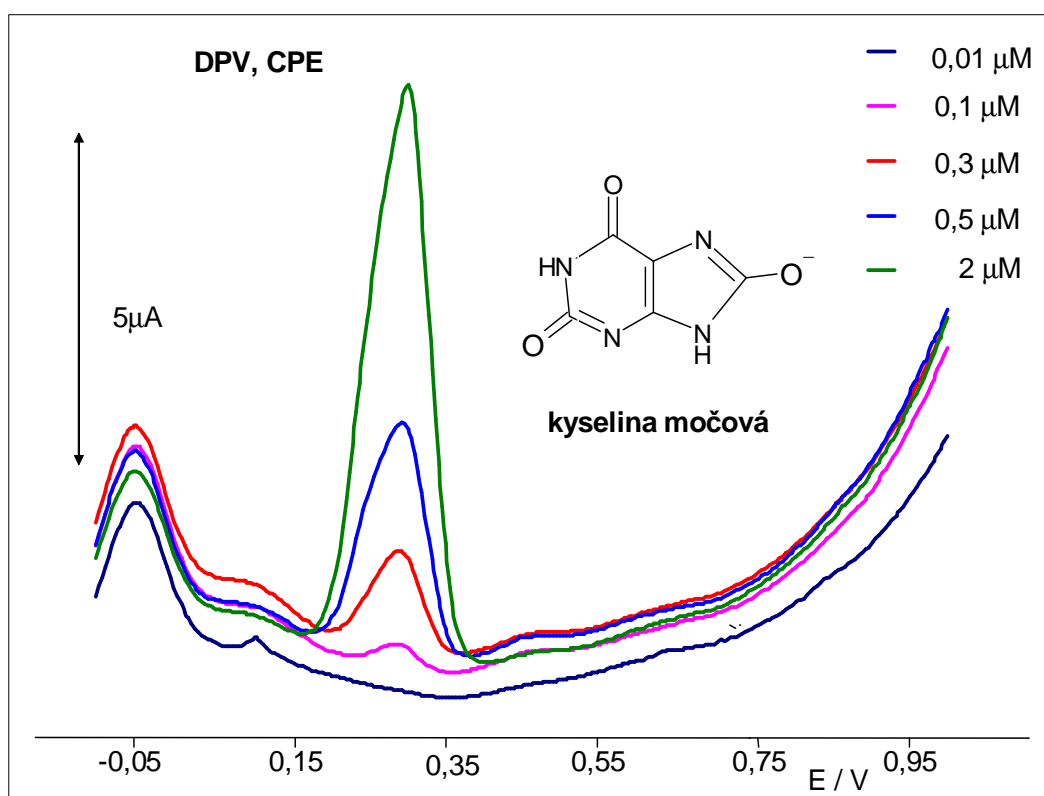
Bylo ukázáno, že v nepřítomnosti Cu(II) je možno KM stanovit elektrochemicky na HMDE ve středně alkalickém prostředí pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie [19]. Jako u dalších derivátů purinu, se tento signál nacházel u dosti pozitivních potenciálů, blízko hodnot, kde dochází k rozpouštění elektrodové rtuti. Voltametrická analýza v přítomnosti mědi je založena na tvorbě komplexu Cu(I)-purin, který je generován elektrochemicky na elektrodě. Tvorba komplexu probíhala při potenciálu -0,3 V. Měření ukázala, že voltametrický pík je lokalizován mnohem negativněji, takže získaný signál je mnohem symetričtější a dobře měřitelný. Potenciál rozpouštěcího píku je přibližně u potenciálu -0,5 V v závislosti na podmínkách měření a na druhu purinového derivátu. Cyklický voltamogram pro koncentraci KM 125 nM a 650 nM v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 je znázorněn na Obr. 18B.



Obr. 18. (A) – Kalibrační křivka KM. (B) – cyklické voltamogramy KM v koncentraci 125 nM a 650 nM. Parametry měření: CV, HMDE, plocha kapky 0,4 mm² doba deposice 120 s, potenciál depozice -0,3 V, rychlost polarizace 0,5 V/s. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru, pH 6,48 při pokojové teplotě.

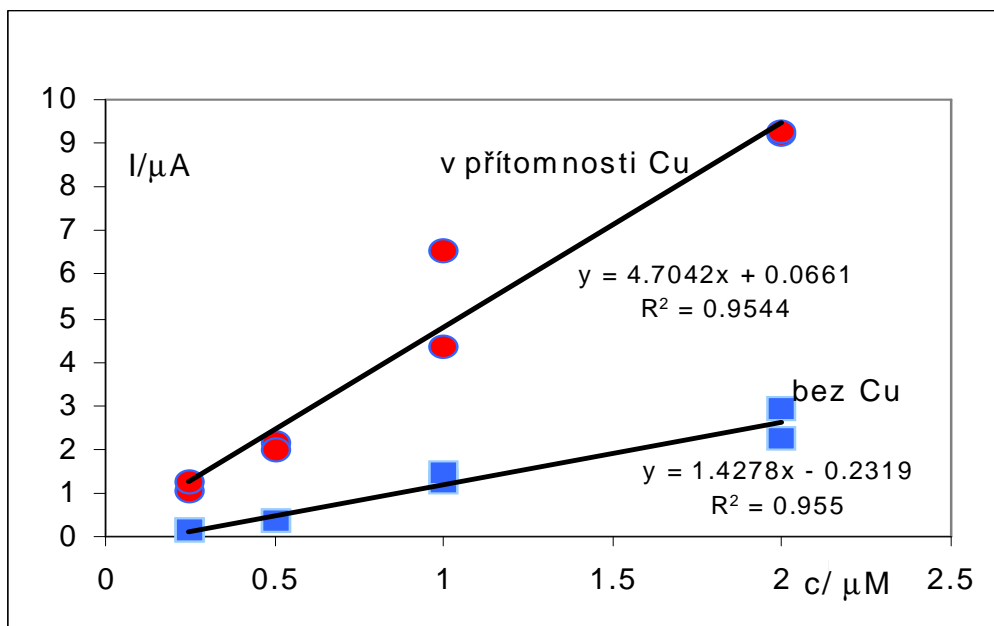
Kalibrační křivka pro KM byla získána pro koncentrační interval 12,5-500 nM. Z obr. 18A je vidět, že tato závislost je lineární a regresní koeficient vyhovující. Ve srovnání s publikovanými výsledky je moje stanovení v souladu s výsledky získanými pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie.

Stanovení KM bylo provedeno na uhlíkové pastové elektrodě v přítomnosti Cu(II) metodou DPV. Komplex Cu(I)-purinu byl vygenerován při potenciálu -0.1 V, a voltametrický pík se objevil přibližně při 0,3 V. S rostoucí koncentrací KM se signál zvyšoval a u koncentrace KM 2 μM odpovídala jeho výška asi 9,5 μA . Kalibrační křivka v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 byla naměřena v rozmezí koncentrací 0,01 až 2 μM (Obr. 19).



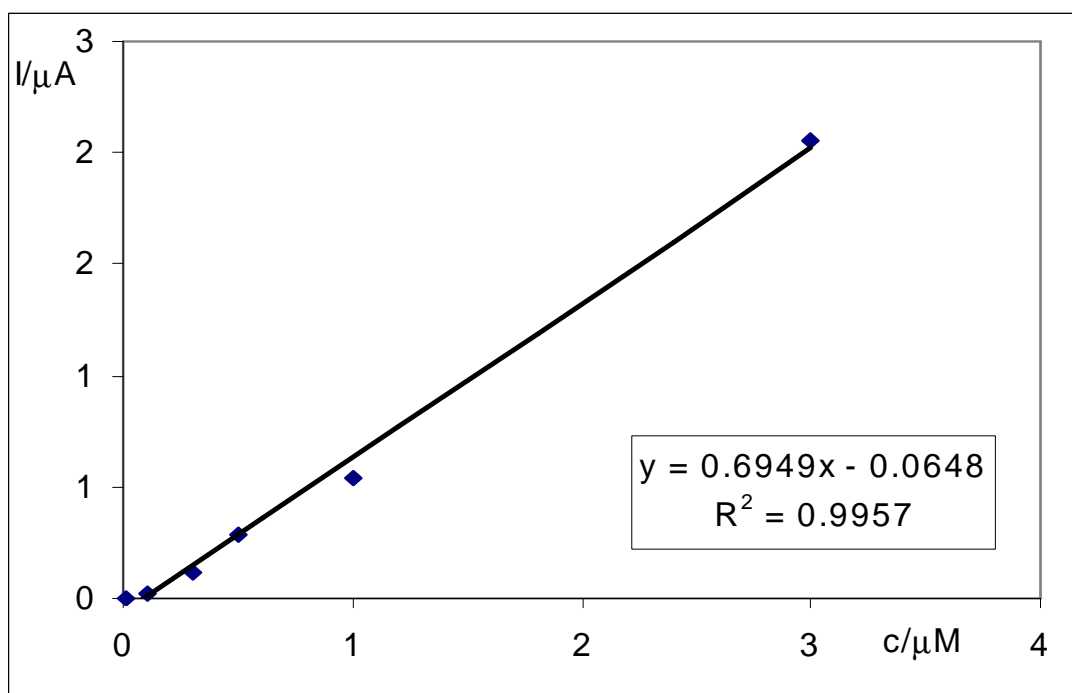
Obr. 19. DPV voltamogramy KM v koncentraci 2 μM , 0,5 μM , 0,3 μM , 0,1 μM a 0,01 μM v přítomnosti 20 μM Cu (II). Parametry měření: DPV, CPE, doba deposice 120 s, počáteční potenciál $E_i = -0,1$ V, amplituda 50 mV, step potenciál 2 mV. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 při pokojové teplotě.

Analogická měření na uhlíkové elektrodě se vzorkem, který neobsahoval žádnou měď ukázala, že oxidační signál KM je asi 3x nižší než za přítomnosti mědi. Srovnání je graficky zobrazeno na Obr.20.



Obr. 20. Kalibrační křivka KM v přítomnosti a nepřítomnosti Cu (II). Koncentrace Cu(II) 20 μM .

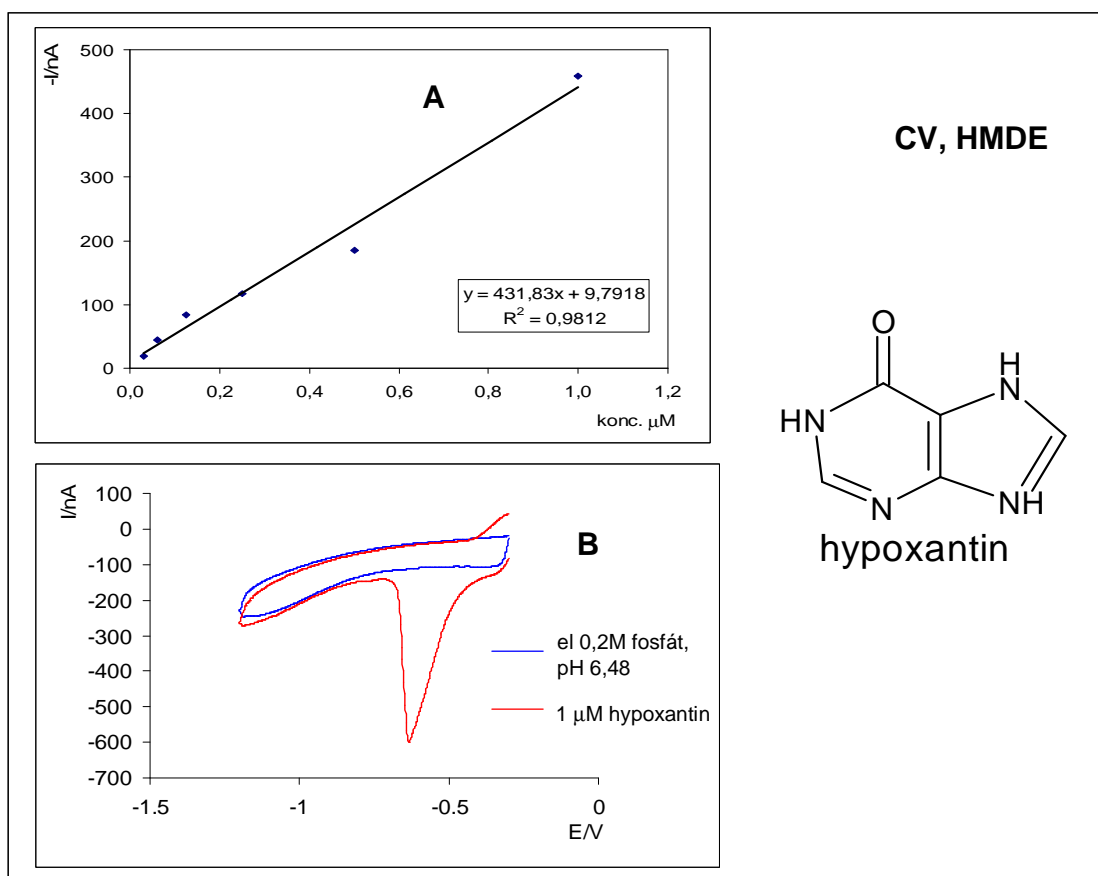
Kalibrační křivka pro KM na CPE byla získána pro koncentrační interval 0,01-3 μM (Obr. 21). Z Obr. 21 je vidět, že tato závislost je lineární a regresní koeficient je vyhovující. Ve srovnání s publikovanými výsledky je moje stanovení v souladu s výsledky získanými pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie v nepřítomnosti mědi.



Obr. 21. Kalibrační křivka pro KM na CPE.

4.2 Stanovení xantinu a hypoxantinu

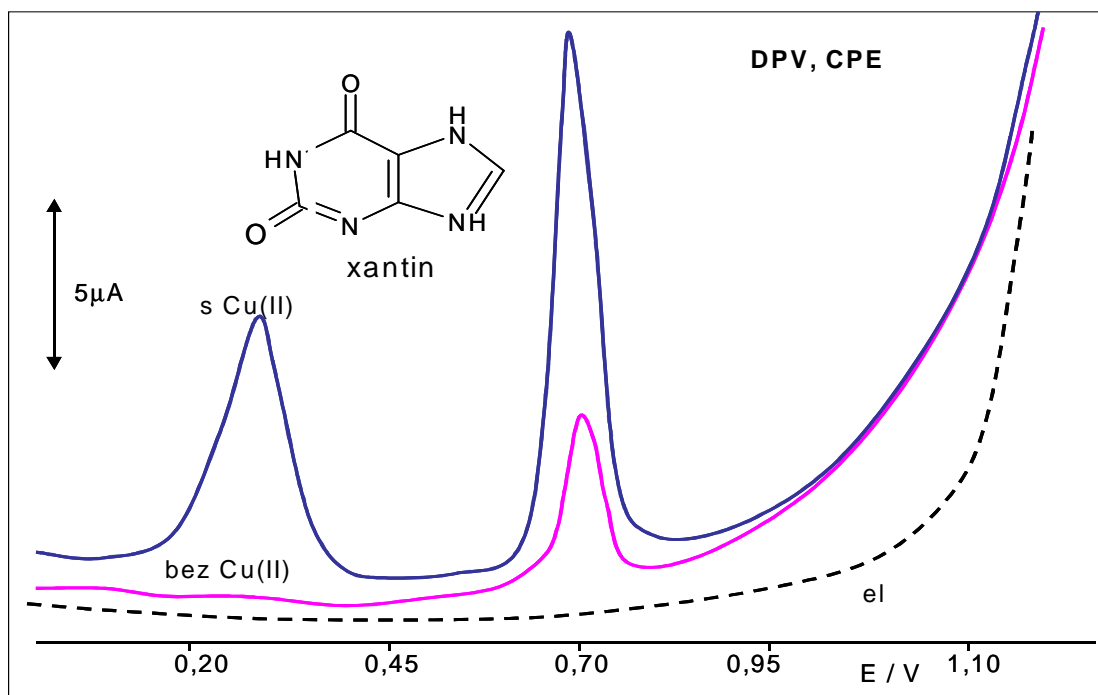
Xantin a hypoxantin jsou významnými meziprodukty odbourávání purinů, které se dále v těle převádějí na KM. Ve své DP jsem se zabývala stanovením obou látek jak na rtuťové, tak i na uhlíkové elektrodě. Hypoxantin o koncentraci $1\ \mu\text{M}$ poskytl v $0,2\ \text{M}$ fosfátovém pufru o pH 6,48 na HMDE voltametrický signál podobný signálu KM (Obr. 22 B). Ve srovnání s KM byl pík hypoxantinu posunut k negativnějším potenciálům; jeho potenciál je $-0,65\ \text{V}$. Koncentrační závislost jsem naměřila v rozmezí koncentrací $0,05\text{--}1,2\ \mu\text{M}$ s docela uspokojivým koeficientem regrese (Obr. 22 A). Xantin vykazoval signál velice odobný hypoxantinu.



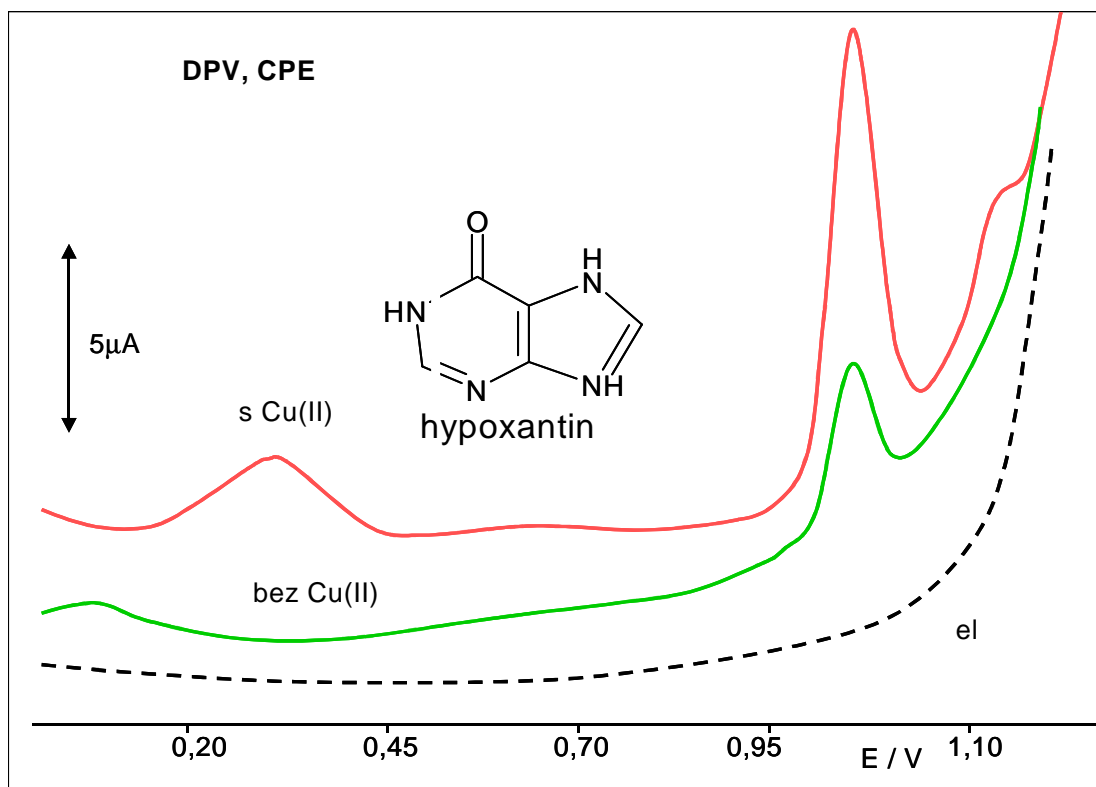
Obr. 22. (A) – Kalibrační křivka hypoxantinu. (B) – cyklické voltamogramy hypoxantinu v koncentraci $1\ \mu\text{M}$. Parametry měření: CV, HMDE, plocha kapky $0,4\ \text{mm}^2$, doba depozice $120\ \text{s}$, potenciál depozice $-0,3\ \text{V}$, rychlost polarizace $0,5\ \text{V/s}$. Měření byla provedena v $0,2\ \text{M}$ fosfátovém pufru, pH 6,48 při pokojové teplotě.

Z DPV výsledků získaných na CPE v nepřítomnosti mědi je zřejmé, že voltametrické křivky xantinu a hypoxantinu se liší. Zatímco xantin dává oxidační signál přibližně při $0,70\ \text{V}$, tak hypoxantin poskytuje obdobný signál při $1,05\ \text{V}$. Jejich výška je při koncentraci $10\ \mu\text{M}$ srovnatelná. Předpokládá se, že oxidační mechanismus u hypoxantinu zahrnuje ztrátu dvou elektronů a dvou protonů, podobně, jak bylo zjištěno v případě guaninu [36, 58]. Energeticky snazší oxidaci v případě xantinu je možno vysvětlit rozdílnou polohou oxy skupiny v jeho molekule [59]. Po přidavku Cu(II) (v koncentraci $20\ \mu\text{M}$) se původní DPV signály zvýšily

(u xantinu 3krát, u hypoxantinu 2,26krát) a jak u xantinu, tak u hypoxantinu se objevil další signál při negativnějším potenciálu – u xantinu při 0,27 V, u hypoxantinu při 0,32 V (Obr. 23 a 24). Nově pozorované signály po přidavku mědi odpovídají oxidaci Cu(I) na Cu(0) jak již bylo popsáno dříve [52]. Koncentrační závislosti v obou případech byly lineární v podobném koncentračním intervalu jak je uvedeno pro KM.



Obr. 23. DPV voltamogramy xantinu v koncentraci $10 \mu M$ v přítomnosti a nepřítomnosti $20 \mu M$ Cu (II). Parametry měření: DPV, CPE, doba deposice 120 s, počáteční potenciál $E_i = -0,1$ V, amplituda 50 mV, step potenciál 2 mV. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 při pokojové teplotě.



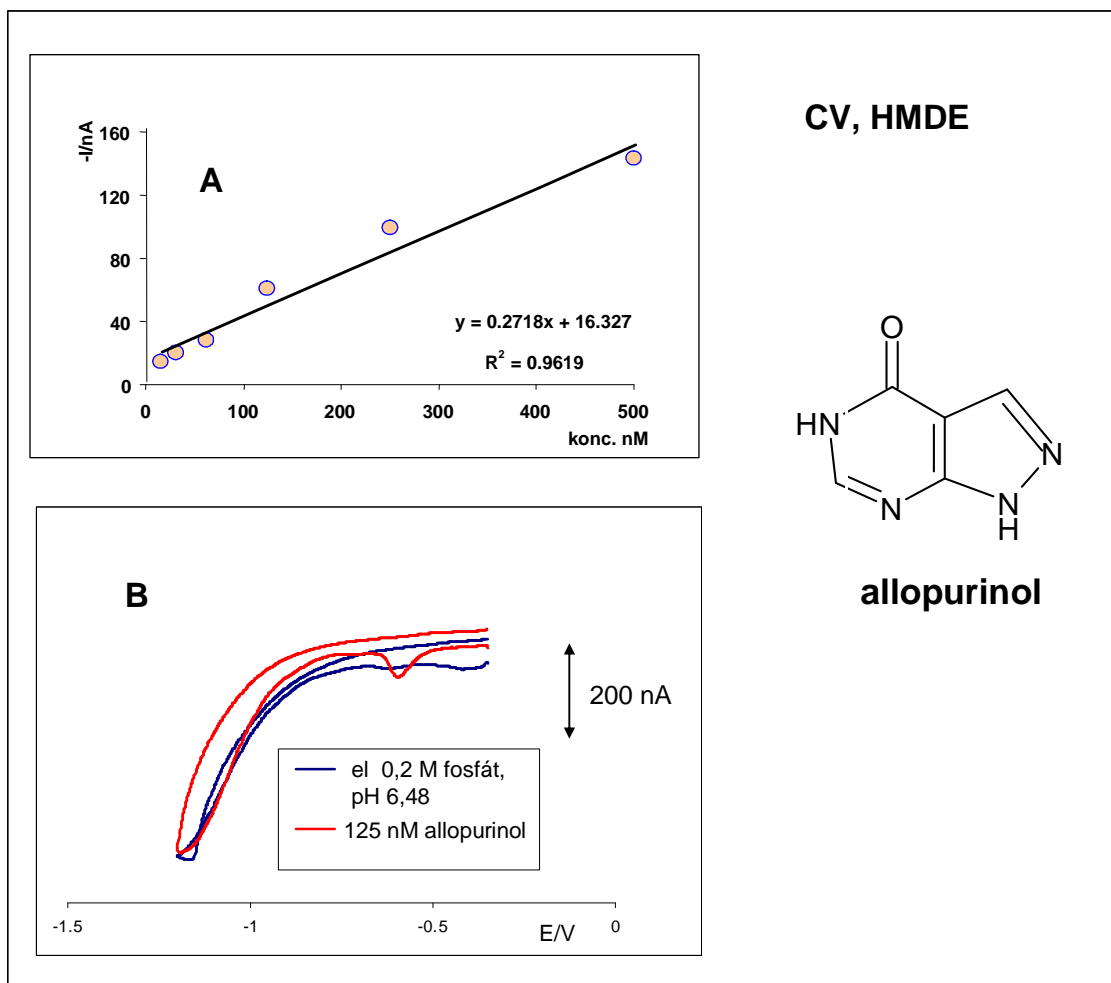
Obr. 24. DPV voltamogramy hypoxantinu v koncentraci 10 μ M v přítomnosti a nepřítomnosti 20 μ M Cu (II). Parametry měření: DPV, CPE, doba deposice 120 s, počáteční potenciál $E_i = -0,1$ V, amplituda 50 mV, step potenciál 2 mV. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 při pokojové teplotě.

4.3 Stanovení allopurinolu a oxypurinolu

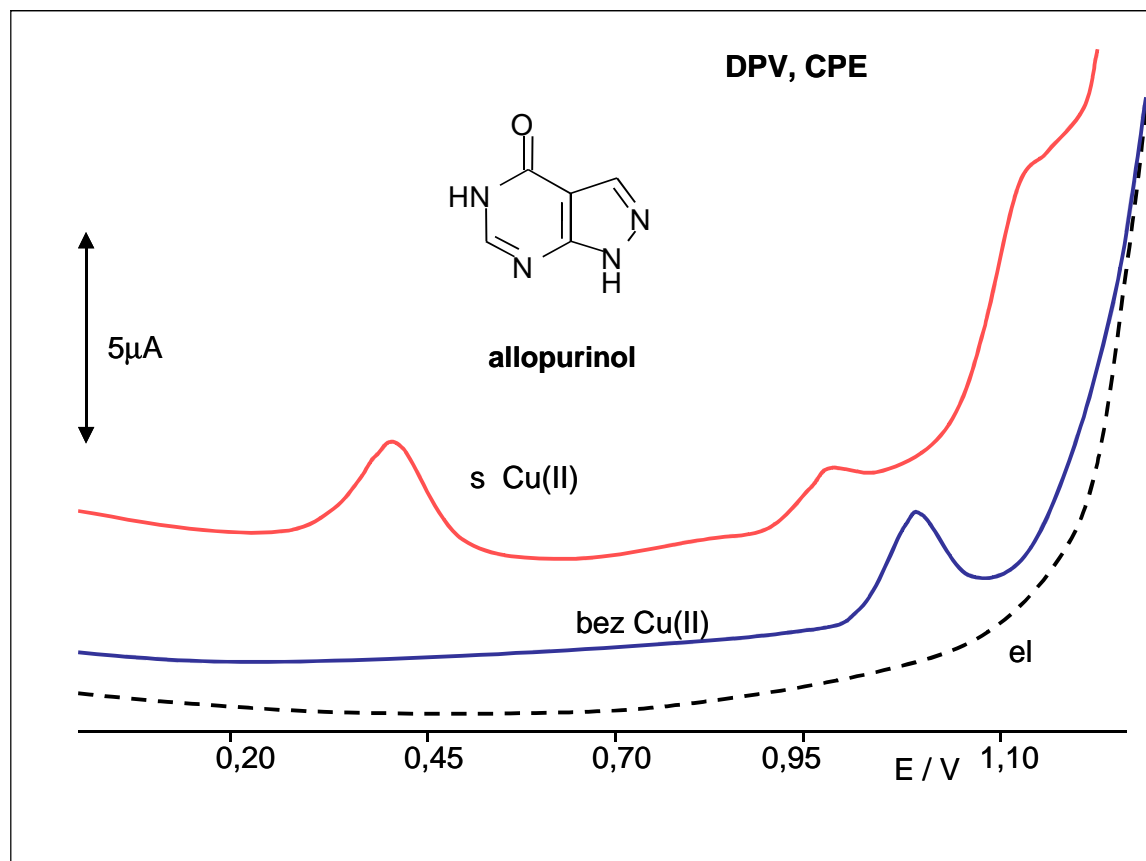
Oxypurino a allopurinol jsou strukturními analogy xantinu a hypoxantinu. Ve své DP jsem se zabývala stanovením allopurinolu jak na rtuťové, tak i na uhlíkové pastové elektrodě a stanovením oxypurinolu na uhlíkové pastové elektrodě.

Allopurinol o koncentraci 125 nM vykazuje v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 na HMDE v přítomnosti Cu(II) oxidační signál velice podobný signálu hypoxantinu (Obr. 26 B). Koncentrační závislost jsem naměřila v rozmezí koncentrací 10-500 nM s docela uspokojivým koeficientem regrese (Obr. 25 A).

Z DPV výsledků získaných pro allopurinol na CPE v nepřítomnosti mědi je zřejmé, že voltametrické křivky allopurinolu a hypoxantinu jsou velice podobné. Zatímco hypoxantin dává oxidační signál přibližně při 1,05 V, tak allopurinol poskytuje obdobný signál při 1,04 V. V přítomnosti Cu(II) se objevily dva voltametrické signály, jeden při potenciálu 0,97 V, a druhý při potenciálu 1,12 V v blízkosti vylučování základního elektrolytu. Tvorba komplexu Cu(I)-purin, který je generován elektrochemicky na elektrodě, probíhala při potenciálu $E_i = -0,1$ V.

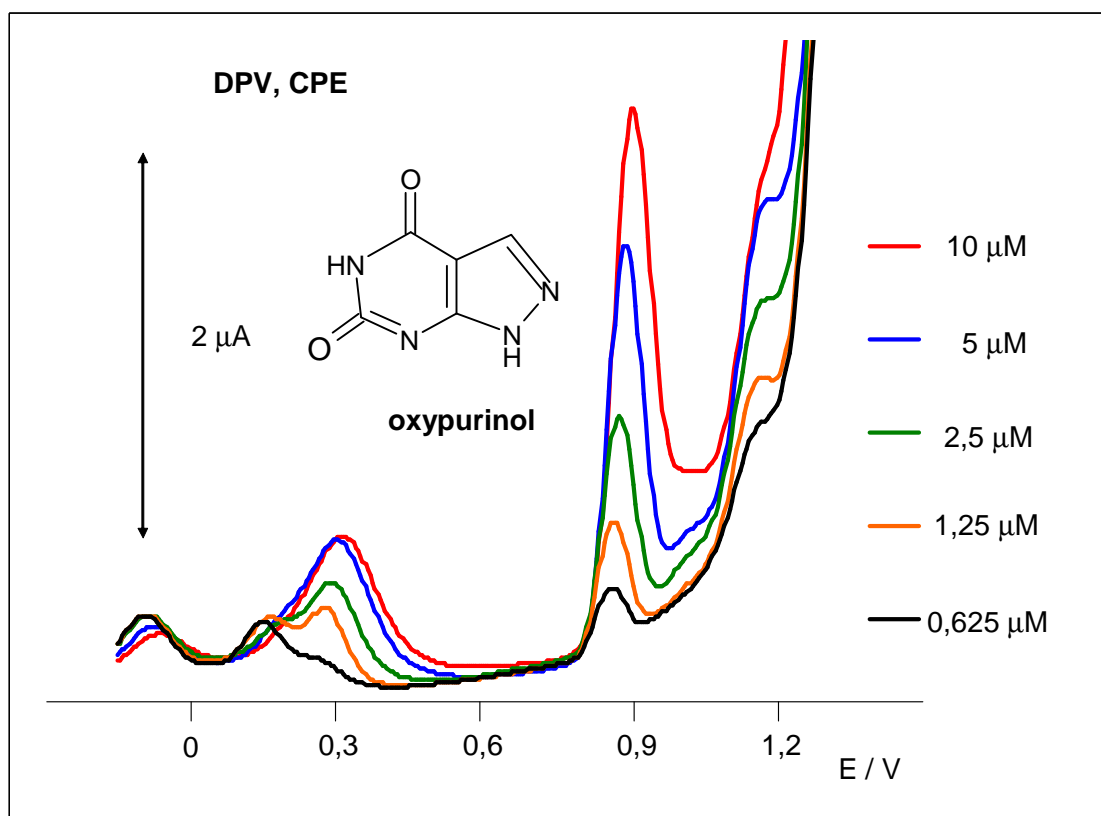


Obr. 25. (A) Kalibrační křivka allopurinolu. (B) – cyklické voltamogramy KM v koncentraci 125 nM a 650 nM. Parametry měření: CV, HMDE, plocha kapky 0,4 mm² doba deposice 12 s, potenciál deposice -0,3 V, rychlost polarizace 0.5 V/s. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru, pH 6,48 při pokojové teplotě.

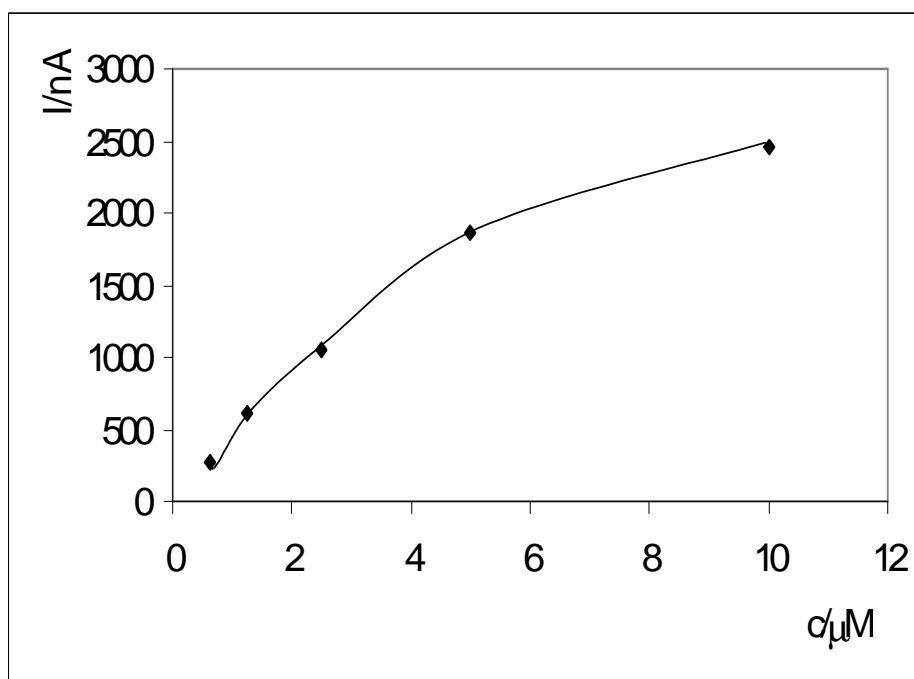


Obr. 26. DPV voltamogramy allopurinolu v koncentraci $10 \mu\text{M}$ v přítomnosti a nepřítomnosti $20 \mu\text{M}$ Cu (II). Parametry měření: DPV, CPE, doba deposice 120 s, počáteční potenciál $E_i = -0,1 \text{ V}$, amplituda 50 mV, step potenciál 2 mV. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 při pokojové teplotě.

Stanovení oxypurinolu bylo provedeno na uhlíkové pastové elektrodě v přítomnosti Cu(II) metodou DPV. Komplex Cu(I)-oxypurinol byl vygenerován při potenciálu $E_i = -0,1 \text{ V}$, a voltametrický pík se objevil přibližně při 0,9 V. S rostoucí koncentrací oxypurinolu se signál zvyšoval a u koncentrace oxypurinolu $10 \mu\text{M}$ odpovídala jeho výška asi $2 \mu\text{A}$ (Obr. 27). Z DPV výsledků získaných pro allopurinol a xantin na CPE v přítomnosti mědi je zřejmé, že voltametrické křivky oxypurinolu a xantinu jsou velice podobné. Zatímco xantin dává oxidační signál přibližně při 0,7 V, tak allopurinol poskytuje obdobný signál při 0,9 V. Kalibrační křivka pro oxypurinol na CPE v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 byla naměřena v rozmezí koncentrací 0,625 až $10 \mu\text{M}$ (Obr. 28).



Obr. 27. DPV voltamogramy oxypurinolu v koncentraci 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M a 0,625 μ M v přítomnosti 20 μ M Cu (II). Parametry měření: DPV, CPE, doba deposice 120 s, počáteční potenciál $E_i = -0,1$ V, amplituda 50 mV, step potenciál 2 mV. Měření byla provedena v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 6,48 při pokojové teplotě.



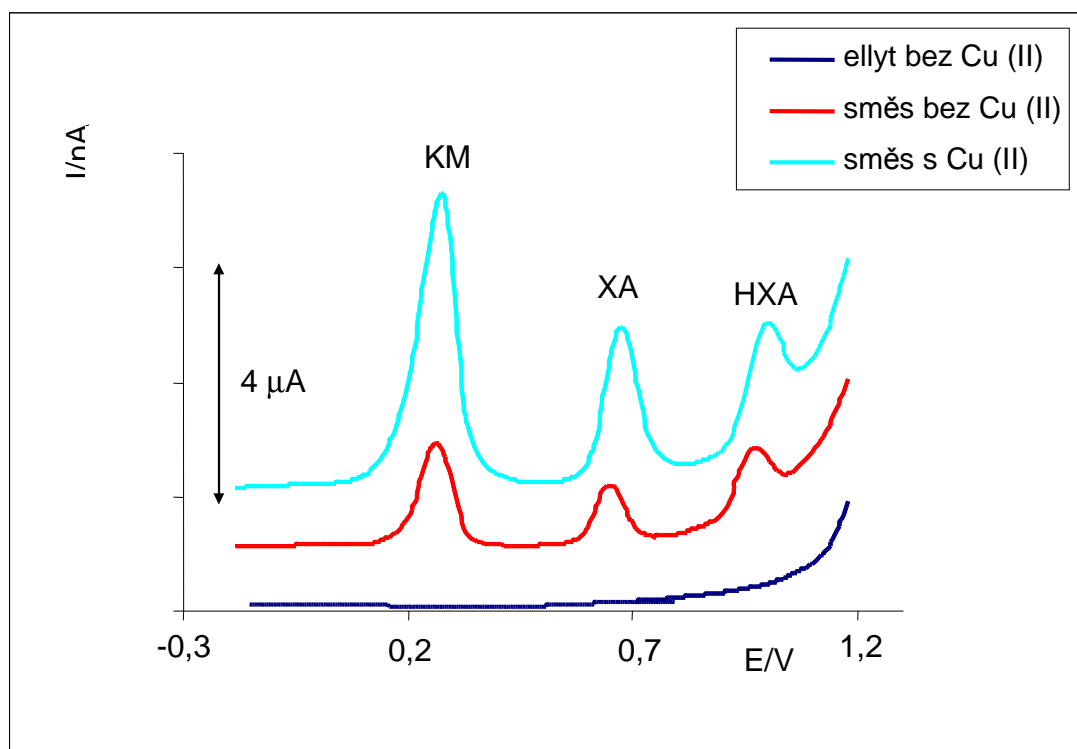
Obr. 28. Kalibrační křivka pro oxypurinol na CPE

4.4 Stanovení allantoinu

Allantoin jsem měřila elektrochemicky jak na HMDE, tak na CPE v prostředí 0,2 M fosfátového pufru, pH 6.48. V obou případech se žádný voltametrický signál v koncentracích 10 a 50 μM neobjevil.

4.5 Stanovení kyseliny močové, xantinu a hypoxantinu ve směsi

Pokusila jsem se rovněž informativně změřit pomocí DPV na CPE směs několika purinových derivátů v roztoku fosfátového pufru. Měření jsem provedla s KM, xaninem a hypoxaninem, a porovнала voltamogramy v přítomnosti a v nepřítomnosti Cu(II) (Obr. 29).



Obr. 29 Diferenční pulzní voltamogram směsi kyseliny močové (KM), xantinu (XA) a hypoxantinu (HXA). CPE, amplituda 50 mV, 0,2 M fosfátový pufr, pH 6,48. Koncentrace: KM 25 μM , XA 15 μM , HXA 15 μM , Cu (II) 20 μM .

Je zřejmé, že všechny deriváty poskytují v nepřítomnosti Cu(II) voltametrické signály, které byly popsány výše. Po přidavku Cu(II) se výška těchto signálů zvýší a nepatrně se posunou k pozitivním potenciálům. Signál KM se zvýšil 2,2krát, XA 2,66krát a HXA 1,75krát.

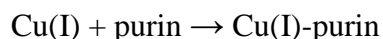
5 ZÁVĚR

Stanovení obsahu purinových derivátů ve vzorku je důležitou metodou při analýze v biotechnologii. Purinové metabolity představují významnou skupinu látek, které se účastní mnoha biochemických reakcí. Jejich koncentrace se zpravidla určují v tělních tekutinách a odchylky od normálních hodnot signalizují podezření na onemocnění. Z tohoto důvodu je třeba kontrolovat jejich hladiny nezávislými analytickými metodami.

Ve své práci jsem se snažila pomocí rozpouštěcí voltametrie optimalizovat podmínky pro stanovení purinových derivátů v přítomnosti kationtů dvojmocné mědi.

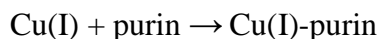
Studovala jsem deriváty purinů, kyselinu močovou, xantin a hypoxantin, a jejich analoga, allopurinol, oxypurinol a allantoin pomocí elektrochemických metod. Nejvýhodnější metodou se ukázala být cyklická voltametrie ve spojení se rtuťovou kapkovou elektrodou a diferenční pulzní voltametrie ve spojení s uhlíkovou pastovou elektrodou. Stanovení bylo provedeno technikou rozpouštěcí voltametrie v přítomnosti Cu(II) a je založeno na tvorbě komplexu Cu(I)-purin, jeho nahromadění na elektrodě, a jeho následným rozpuštěním za vzniku voltametrického píku. Příslušné rovnice jsou na schématu:

HMDE: 1. krok $\text{Cu(II)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu(I)}$



2. krok $\text{Cu(I)-purin} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu(0)} + \text{purin}$

CPE: : 1. krok $\text{Cu(II)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu(I)}$



2. krok $\text{Cu(I)-purin} \rightarrow \text{Cu(II)} + \text{purin} + \text{e}^-$

Ve své práci jsem měřila koncentrační závislosti uvedených látek v prostředí fosfátového pufru o pH 6,48 a optimalizovala podmínky pro stanovení purinových derivátů a jejich analogů. Výsledky mých experimentů ukázaly, že je možno tyto látky stanovit elektrochemicky ve velmi nízkých koncentracích. Na závěr byla proměřena směs kyseliny močové, xantinu a hypoxantinu ve vzorku.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Štulík, K., Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*, 1989,
- [2] Bard, A. J., Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, 1980,
- [3] Brett, C. M. A., Brett, A. M. O.: *Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications*, 1993,
- [4] Vydra, F., Štulík, K., Juláková, E.: *Electrochemical Stripping Analysis*, 1973,
- [5] Wang, J., Kawde, A. B.: Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 2002, 127, 383-386.
- [6] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, 2003, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava: 2003.132s
- [7] Dostupné z: [online] [cit. 2007-03-20] URL: http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/trnkova/elanalmet/navody/uloha%209/9-Stripping%20DPV_navod.pdf
- [8] Gutnecht, W. F., Perone, S. P.: Numerical deconvolution of overlapping stationary electrode polarographic curves with an on-line digital computer, *Anal. Chem.*, 1970, 42, 906-917.
- [9] Kemula, W., Kublik, Z., Glodowski, S.: Analytical application of the hanging mercury drop electrode : Determination of impurities in high purity zinc, *J. Electroanal. Chem.*, 1959, 1, 91-100.
- [10] Palecek, E., Jelen, F., Teijeiro, C., Fucik, V., Jovin, T. M.: Biopolymer-modified electrodes. Voltammetric analysis of nucleic acids and proteins at the submicrogram level, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 273, 175-186.
- [11] Palecek, E., Postbieglova, I.: Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer, *J. Electroanal. Chem.*, 1986, 214, 359-371.
- [12] Palecek, E.: New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1988, 20, 171-194.
- [13] Palecek, E., Jelen, F.: in: Palecek, E., Scheller, F., Wang, J. (Eds.). *Perspectives in Bioanalysis. Vol. 1 Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, vol.1, Elsevier, New York, 2005, p. 74-173.
- [14] Jelen, F., Palecek, E.: Chemically reversible electroreduction of guanine in a polynucleotide chain, *Biophys. Chem.*, 1986, 24, 285-290.
- [15] Fojta, M.: Elektrochemická analýza nukleových kyselin: Historie a současné směry, *Biol. Listy*, 1996, 61, 81-99.
- [16] [online] [cit. 2007-03-22] URL: Dostupné z : <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/AJDJZ.htm>
- [17] Palecek, E.: Reaction of nucleic acid bases with the mercury electrode: determination of purine derivatives at submicromolar concentrations by means of cathodic stripping voltammetry., *Anal. Biochem.*, 1980, 108, 129-138.
- [18] Palecek, E., Jelen, F.: Reaction of nucleic acid bases with the mercury electrode: determination of submicromolar concentrations of pyrimidine bases by means of cathodic stripping voltammetry., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1980, 45, 3472-3481.

- [19] Palecek, E., Jelen, F., Hung, M. A., Lasovsky, J.: Reaction of the purine and pyrimidine derivatives with the electrode mercury., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1981, 8, 621-631.
- [20] Palecek, E., Fojta, M. J., Jelen, F., Vetterl, V.: in: Bard, A. J., Stratsman, J. (Eds.). *Encyclopedia of Electrochemistry*, vol.9. Bioelectrochemistry, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002, p. 365-429.
- [21] Palecek, E., Jelen, F., Postbieglova, I.: Adsorptive transfer stripping voltammetry offers new possibilities in DNA research., *Stud. biophys.*, 1989, 130, 51-54.
- [22] Richards, J., Weinman, E. J.: Uric acid and renal disease, *J. Nephrol.*, 1996, 9, 160-166.
- [23] Zen, J. M., Hsu, C. T.: A selective voltammetric method for uric acid detection at Nafion (R)-coated carbon paste electrodes, *Talanta*, 1998, 46, 1363-1369.
- [24] Yan, Z., Zhang, J. R., Fang, H. Q.: Electrocatalytic oxidation of uric acid at cysteine modified glassy carbon electrode, *Anal. Lett.*, 1999, 32, 223-234.
- [25] Popa, E., Kubota, Y., Tryk, D. A., Fujishima, A.: Selective voltammetric and amperometric detection of uric acid with oxidized diamond film electrodes, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1724-1727.
- [26] Cavaleiro, E. T. G., El-Nour, K. A., Brajter-Toth, A.: Possibilities of the use of fast scan voltammetry in simultaneous determination of purines at carbon fiber ultramicroelectrodes, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2000, 11, 512-515.
- [27] Brajter-Toth, A., Abou El-Nour, K., Cavaleiro, E. T., Bravo, R.: Nanostructured carbon fiber disk electrodes for sensitive determinations of adenosine and uric acid, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1576-1584.
- [28] Shi, K., Shiu, K. K.: Determination of uric acid at electrochemically activated glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 2001, 13, 1319-1325.
- [29] Wang, J., Freiha, B. A.: Preconcentration of uric acid at a carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1984, 12, 225-234.
- [30] Kristensen, E. W., Kuhr, W. G., Wightman, R. M.: Temporal Characterization of Perfluorinated Ion-Exchange Coated Microvoltammetric Electrodes for Invivo Use, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1752-1757.
- [31] Rocheleau, M. J., Purdy, W. C.: The Application of Quaternary Ammonium Ionic Polymers to Electroanalysis. 2. Voltammetric Studies with Quaternary Ammonium Functionalized Polymer Film-Coated Electrodes, *Electroanalysis*, 1991, 3, 935-939.
- [32] Zen, J. M., Lai, Y. Y., Yang, H. H., Kumar, A. S.: Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2002, 84, 237-244.
- [33] Goyal, R. N., Gupta, V. K., Sangal, A., Bachheti, N.: Voltammetric determination of uric acid at a fullerene-C-60-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 2005, 17, 2217-2223.
- [34] Kachoosangi, R. T., Banks, C. E., Compton, R. G.: Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using edge plane pyrolytic graphite electrodes, *Electroanalysis*, 2006, 18, 741-747.
- [35] Spataru, N., Sarada, B. V., Tryk, D. A., Fujishima, A.: Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application, *Electroanalysis*, 2002, 14, 721-728.

- [36] Oliveira-Brett, A. M., Silva, L. A., Farace, G., Vадgama, P., Brett, C. M. A.: Voltammetric and impedance studies of inosine-5'-monophosphate and hypoxanthine, *Bioelectrochemistry*, 2003, 59, 49-56.
- [37] Palmisano, F., Cataldi, T. R. I., Zambonin, P. G.: Anodic Behavior of Allopurinol and Oxypurinol and Their Determination by High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection - a Preliminary Note, *Annali Di Chimica*, 1984, 74, 187-196.
- [38] Dryhurst, G., De, P. K.: Direct Electrochemical Method for Determination of Allopurinol and Uric-Acid Mixtures - Adsorption of Uric-Acid at Pyrolytic-Graphite Electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1972, 58, 183-&.
- [39] De, P. K., Dryhurst, G.: Electrochemical Reduction of Allopurinol, *J. Electrochem. Soc.*, 1972, 119, 837-&.
- [40] Palmisano, F., Desimoni, E., Zambonin, P. G.: High-Performance Liquid-Chromatography with Polarographic and Voltammetric Anodic Detection - Simultaneous Determination of Allopurinol, Oxipurinol and Uric-Acid in Body-Fluids, *J. Chromat.*, 1984, 306, 205-214.
- [41] Glodowski, S., Bilewicz, R., Kublik, Z.: Determination of Traces of Purine By Cathodic Stripping Voltammetry At the Hanging Copper Amalgam Drop Electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1986, 186, 39-47.
- [42] Glodowski, S., Bilewicz, R., Kublik, Z.: Cathodic and anodic stripping determination of traces of adenine and adenosine based on accumulation of copper compounds at mercury or amalgam electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 1987, 201, 11- 22.
- [43] Shiraishi, H., Takahashi, R.: Accumulation of Adenine and Guanine as Cu⁺ Compounds at Glassy-Carbon Electrodes Followed by Anodic-Stripping Voltammetry, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1993, 31, 203-213.
- [44] Farias, P. A. M., Wagener, A. D., Castro, A. A.: Ultratrace determination of adenine in the presence of copper by adsorptive stripping voltammetry., *Talanta*, 2001, 55, 281-290.
- [45] Farias, P. A. M., Wagener, A. D. R., Castro, A. A.: Adsorptive voltammetric behavior of adenine in presence of guanine and some trace elements at the static mercury drop electrode, *Anal. Lett.*, 2001, 34, 2125-2140.
- [46] Farias, P. A. M., Wagener, A. D. R., Bastos, M. B. R., da Silva, A. T., Castro, A. A.: Cathodic adsorptive stripping voltammetric behaviour of guanine in the presence of copper at the static mercury drop electrode, *Talanta*, 2003, 61, 829-835.
- [47] Abdullin, I. F., Bakanina, Y. N., Turova, E. N., Budnikov, G. K.: Determination of uric acid by voltammetry and coulometric titration, *J. Anal. Chem.*, 2001, 56, 453-456.
- [48] Selvaraju, T., Ramaraj, R.: Simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and homovanillic acid at copper modified electrode, *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 2998-3005.
- [49] Ibrahim, M. S., Ahmed, M. E., Kawde, A. M., Temerk, Y. M.: Adsorption preconcentration and voltammetric determination of xanthine at the hanging mercury drop electrode, *Analisis*, 1996, 24, 6-9.
- [50] Ibrahim, M. S., Temerk, Y. M., Kamal, M. M., Ahmed, G. A. W., Ibrahim, H. S. M.: Ultra-sensitive anodic stripping voltammetry for the determination of xanthine at a glassy carbon electrode, *Microchim. Acta*, 2004, 144, 249-256.

- [51] Shubietah, R. M., Abuzuhri, A. Z., Fogg, A. G.: Sensitive Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Xanthine and Its Derivatives, *Electroanalysis*, 1995, 7, 975-979.
- [52] dosSantos, M. M. C., Lopes, C., Goncalves, M. L. S.: Voltammetric studies of purine bases and purine nucleosides with copper, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1996, 39, 55-60.
- [53] Temerk, Y. M., Kamal, M. M., Ahmed, G. A. W., Ibrahim, H. S. M.: Differential Pulse and Square-Wave Cathodic Stripping Voltammetry of Xanthine and Xanthosine at a Mercury electrode, *Anal. Sci.*, 2003, 19, 115-119.
- [54] [online] [cit. 2007-04-10] URL:
Dostupné z: http://www.feec.vutbr.cz/EEICT/2006/sbornik/01-Bakalarske_projekty/06-Mikroelektronika_a_tecnologie/01-sirena.pdf
- [55] Kissinger, P. T.: in: Kissinger, P. T., Heineman, W. R. (Eds.). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 165-194.
- [56] [online] [cit. 2007-04-10] URL:
Dostupné z: <http://old.mendelu.cz/~kizek/publikace/pdf/2006/Navody.pdf>
- [57] Sommer, L.: *Základy analytické chemie II*, 2000.
- [58] Brett, C. M. A., Oliveira-Brett, A. M., Serrano, S. H. P.: On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 366, 225-231.
- [59] Goyal, R. N., Sangal, A.: Insights into the Oxidation Chemistry of 2 Hydroxypurine by Electrochemical Methods, *Electroanalysis*, 2005, 17, 246-254.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
CV	Cyklická voltametrie
NPV	Normální pulzní voltametrie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
NK	Nukleové kyseliny
AdSV	Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie
AdTSV	Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie
KM	Kyselina močová
X	Xantin
HX	Hypoxantin
KA	Kyselina askorbová
GCE	Grafitová uhlíková elektroda
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
CPE	Uhlíková pastová elektroda
t	Čas
c	Koncentrace
E	Elektroodový potenciál
E^0	Standardní elektroodový potenciál
E_{el}	Potenciál předběžné elektrolýzy
E_i	Počáteční elektroodový potenciál
$E_{p/2}$	Potenciál poloviny píku
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál
I	Elektrický proud
I_p	Maximální proud píku
τ	Doba předběžné elektrolýzy
n	Počet elektronů vyměňovaných v elektrochemické reakci